

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIDAD DE POSGRADO

**Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con
actividad lítica para *Vibrio fluvialis***

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Violeta de Jesús FLORES DOMINICK

ASESOR

Susana GUTIÉRREZ MORENO

Lima – Perú

2017



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

Siendo las **13:00 hrs. del 27 de junio de 2017** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes e integrado por los siguientes miembros: Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno (Asesora), Dr. Víctor Crispín Pérez, Mg. Mirtha Roque Alcarraz y la Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BACTERIOFAGO CON ACTIVIDAD LÍTICA PARA *Vibrio fluvialis*"**, presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas **VIOLETA DE JESÚS FLORES DOMINICK**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Muy Bueno (Dieciocho.)

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencias Biológicas **VIOLETA DE JESÚS FLORES DOMINICK**, el Grado Académico de Magíster en **Microbiología**.

Siendo las **15:00** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **15:10** hrs. del 27 de junio de 2017.

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)
Presidenta

Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno (P.P. T.C.)
Miembro - Asesora

Dr. Víctor Crispín Pérez (P.P., T.C.)
Miembro

Mg. Mirtha Roque Alcarraz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo (P. Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:

DEDICATORIA

Dedico esta tesis, en primer lugar, a Dios, quien me dio la fuerza para seguir adelante y poder así culminar con éxito esta etapa de mi vida, en la cual pude entender y valorar cada una de las bendiciones que de Él recibo.

A mis padres, que desde el cielo guían mi camino.

A mi esposo Jesús, por su amor, apoyo y comprensión y ser parte importante en el logro de mis metas profesionales.

A mis hijos Gabriela y Álvaro, por su amor y por ser el maravilloso motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Dra. Susana Gutiérrez Moreno, mi más amplio agradecimiento por su valiosa dirección, paciencia, minuciosidad y motivación constante para obtención del presente grado.

Al Instituto del Mar del Perú, institución científica de renombre internacional y a la cual me siento honrada de pertenecer y que me ha permitido el desarrollo de esta tesis.

A los profesionales de los Laboratorios de Biotecnología Acuática, Cultivo de Peces Marinos, Microbiología Acuática y Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos, gracias por las facilidades brindadas en el uso de equipos e instalaciones.

Al Dr. Toshihiro Nakai, por la caracterización morfológica del bacteriófago Vf1, mediante microscopía electrónica de transmisión realizada en el Laboratorio de Patobiología Acuática de la Universidad de Hiroshima en Japón.

Al Laboratorio de Genética a cargo de la Magíster Giovanna Sotil, por el apoyo brindado en la identificación molecular de la cepa bacteriana.

A la Magister Verónica Sierralta y al Técnico Irving Quinto, gracias mil por su ayuda y buena disposición.

A los Biólogos Carla Fernández y Marco Medina quienes con su juventud, entusiasmo, alegría y brindándome siempre su mejor disposición, han sido un apoyo invaluable a lo largo de todo este proceso. Los quiero mucho.

INDICE

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
ABREVIATURAS	VII
1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Situación Problemática.....	1
1.2. Formulación del Problema.....	3
1.3. Justificación teórica de la Investigación.....	4
1.4 . Justificación práctica de la Investigación	5
1.5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
1.5.1. Objetivo General	7
1.5.2. Objetivos Específicos	7
2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1. Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación.....	8
2.2. Antecedentes de la investigación	8
2.3. Bases teóricas	10
2.3.1. Características del género <i>Vibrio</i> sp.....	10
2.3.2. Bacteriófagos	13
2.3.3. Propiedades de los bacteriófagos	16
2.3.4. Estructura	17
2.3.5. Clasificación.....	18
2.3.6. Ciclo de Vida.....	21
3. CAPITULO III: METODOLOGÍA	25
3.1. Tipo y Diseño de Investigación	25
3.2. Material biológico.....	25
3.2.1. Obtención de bacterias y bacteriófagos	25
3.2.2. Obtención de las bacterias hospederas	25
3.2.3 Identificación fenotípica de la bacteria huésped	26
3.2.4. Identificación molecular de la cepa huésped.....	27
3.2.5. Curva de crecimiento bacteriano.....	27
3.2.5.1. Método Turbidimétrico	28
3.2.5.2. Recuento en placa	28
3.2.6. Aislamiento de bacteriófagos	28
3.2.7. Prueba del “ <i>spot test</i> ” para determinar la presencia de los bacteriófagos	29

3.2.8.	Purificación de las placas de lisis	29
3.2.9.	Amplificación del bacteriófago “stock de trabajo”	30
3.2.10.	Cuantificación del stock trabajo de bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa.	30
3.2.11.	Caracterización por microscopía electrónica del bacteriófago aislado.	31
3.2.12.	Caracterización Biológica del bacteriófago aislado	31
3.2.12.1.	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago	31
3.2.12.2.	Efecto de la exposición a la luz UV	32
3.2.12.3.	Sensibilidad del fago al cloroformo	32
3.2.12.4.	Resistencia del fago al pH	32
3.2.12.5.	Determinación del rango de hospederos	33
3.2.12.6.	Curva de un paso	34
3.2.12.7.	Reducción del crecimiento bacteriano	34
3.2.12.8.	Análisis estadístico	34
4.	CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1.	Resultados.....	36
4.1.1.	Identificación fenotípica de la Cepa 1 mediante el kit API ® 20E (Biomeriux)	36
4.1.2.	Identificación molecular de la Cepa 1	36
4.1.3.	Curva de crecimiento bacteriano.....	37
4.1.4.	Aislamiento y purificación del bacteriófago Vf1	37
4.1.5.	Producción masiva y cuantificación del bacteriófago.....	38
4.1.6.	Caracterización del bacteriófagos Vf1 por microscopía electrónica de transmisión	39
4.1.7.	Caracterización biológica del bacteriófago Vf1	40
4.1.7.1.	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago	40
4.1.7.2.	Efecto a la luz UV	40
4.1.7.3.	Sensibilidad al cloroformo	41
4.1.7.4.	Resistencia del fago Vf1 al pH	42
4.1.7.5.	Determinación del rango de hospederos.....	42
4.1.7.6.	Curva de un paso	43
4.1.7.7.	Reducción de la población bacteriana	44
4.2.	Discusión	45
5.	CONCLUSIONES.....	50
6.	RECOMENDACIONES	51
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos morfológicos básicos de bacteriófagos y tipo de ácido nucleico.....	19
Tabla 2. Morfología, ácido nucleicos y familia de los bacteriófagos. Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado.	21
Tabla 3. Perfil bioquímico de la Cepa 1 según Apiweb®.....	36
Tabla 4. Patrón de sensibilidad al bacteriófago Vf1 frente a diversas cepas.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras proteicas que componen un bacteriófago.....	18
Figura 2. Tipos morfológicos básicos de bacteriófagos.	19
Figura 3. Representación esquemática de las dos alternativas del ciclo replicativo completo del bacteriófago.	24
Figura 4. Fases del ciclo lítico de los bacteriófagos.....	24
Figura 5. Perfil bioquímico 3006526 de la Cepa 1 según Apiweb®	36
Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa <i>V. fluvialis</i> (Cepa1)	37
Figura 7. Capacidad lítica del bacteriófago Vf1 sobre <i>V. fluvialis</i> según prueba de la gota	38
Figura 8. a) Capacidad lítica del bacteriófago Vf1 sobre <i>V. fluvialis</i> según método de la doble capa. b) Placa de Petri totalmente transparente como consecuencia de la capacidad lítica del bacteriófago Vf1 sobre <i>V. fluvialis</i>	38
Figura 9. Micrografías electrónicas del bacteriófago Vf1 que infecta a <i>V. fluvialis</i>	39
Figura 10. Estabilidad térmica del bacteriófago Vf1.....	40
Figura 11. Efecto de la luz UV sobre la viabilidad del fago Vf1 sobre la luz UV.....	41
Figura 12. Sensibilidad del fago Vf1 al cloroformo.....	41
Figura 13. Resistencia del fago Vf1 al pH.....	42
Figura 14. Curva de un paso del bacteriófago Vf1.....	44
Figura 15. Efecto del fago Vf1 sobre la cepa de <i>V. fluvialis</i> en fase logarítmica.....	44

RESUMEN

En esta investigación se aisló un bacteriófago lítico denominado Vf1, procedente del mar peruano, capaz de infectar a *Vibrio fluvialis*, bacteria que afecta humanos y organismos acuáticos. El bacteriófago Vf1 fue caracterizado con respecto a su morfología, estabilidad térmica, diferentes rangos de pH, sensibilidad frente al cloroformo, exposición a la luz UV, rango de hospederos y la curva de crecimiento de un paso. La microscopía electrónica de transmisión, evidenció cabeza de forma icosaedrica con un diámetro de 82.773 nm y un talo largo no contráctil de 142.318 nm de longitud, características propias a la familia *Siphoviridae*. El fago Vf1, fue resistente al calor a 20°C por 30 minutos, perdiendo su viabilidad a partir de 50 y 60°C; y en valores de pH entre 7 y 8 mantuvo títulos elevados, disminuyendo el título entre 5 y 6, siendo nulo a valores de pH ácido. La viabilidad frente a la exposición al cloroformo, evidenció una reducción en el título del 50% y frente a la luz UV, la reducción fue del 100% a 90 segundos de exposición. En la curva de crecimiento de un paso evidenció un período de latencia de 20 minutos y el tamaño de la explosión o *burst size* fue 602 partículas por centro infectivo. Los parámetros biológicos evaluados en este estudio evidenciaron el potencial del bacteriófago Vf1 para poder ser utilizado en fagoterapia, además, la metodología evaluada podría ser utilizado para el aislamiento de otros bacteriófagos de ambientes marinos.

Palabras clave: bacteriófago Vf1, *Vibrio fluvialis*,

ABSTRACT

In this research, a lytic bacteriophage called Vf1, infecting *V. fluvialis* bacterium that infects humans and aquatic organisms, was isolated from the Peruvian Sea. The bacteriophage Vf1 was characterized with respect to its morphology, thermal stability, different pH ranges, sensitivity to chloroform exposure to UV light, host range and one-step growth curve. Transmission electron microscopy showed an icosahedral head with a diameter of 82,773 nm and a non-contractile long tail whose length was 142.318 nm, characteristic of the *Siphoviridae* family. Vf1 phage was heat resistant at 20 ° C for 30 minutes, losing their viability at 50 and 60 ° C; and at pH between 7 and 8, maintained high titers, decreasing between 5 and 6, being zero at values of acid pH. Exposure to chloroform showed a 50% reduction in viability and 100% at 90 seconds of exposure to UV light. In the one-step growth curve showed a 20-minute latency period and the burst size was 602 particles per infective center. The biological parameters evaluated in this study, evidenced the potential of bacteriophage Vf1 to be used in phage therapy; in addition, the methodology evaluated could be used for the isolation of other bacteriophages from marine environments.

Key words: bacteriophage, Vf1, *V. fluvialis*

ABREVIATURAS

- ADN : Ácido Desoxirribonucleico
- ARN : Ácido Ribonucleico
- ClCa_2 : Cloruro de Calcio
- NaCl : Cloruro de Sodio
- TSA : Agar Tripticasa de Soya
- TSB : Caldo Tripticasa de Soya
- UFC/ml : Unidades formadoras de colonias por mililitro
- UFP/ml : Unidades formadoras de placas por mililitro

1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática

Las enfermedades infecciosas están catalogadas entre las primeras causas de muerte en el mundo y, por lo tanto, son consideradas un problema de Salud Pública. Entre ellas, las infecciones bacterianas ocasionan gran preocupación, dado que las bacterias adquieren día a día mayor resistencia a los antimicrobianos, por medio de diversos mecanismos fisiológicos y moleculares que les permiten adaptarse rápidamente a condiciones adversas (Prada, 2015).

Por más de medio siglo, desde el descubrimiento de la penicilina, los tratamientos de las infecciones bacterianas siempre se basaron en el uso de estas sustancias. Sin embargo, la propagación y la emergencia de la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos, producto del empleo indiscriminado en humanos, animales y plantas, ha hecho que estos compuestos, sean cada vez más ineficaces (Teuber, 2001; Fishchetti, 2008) por lo que actualmente, enfrentamos la amenaza de "superbacterias", es decir, bacterias patógenas resistentes a la mayoría o la totalidad de antimicrobianos disponibles (Parisien *et al.*, 2008).

La diseminación de la resistencia bacteriana, podría llegar a generar problemas de enormes dimensiones, como aumentos en la mortalidad, la morbilidad y los costos de atención médica. El reporte de riesgos globales emitido por el Foro Económico Mundial resaltó este problema en el año 2013 (World Economic Forum, 2013); ya la Organización Mundial de la Salud en el 2008, advirtió que el mundo se dirige a una época de pre antibiótico (Parisien *et al.*, 2008) y lo enfatizó en uno de sus últimos reportes (WHO 2014). Sólo en Estados Unidos cada año, se presentan 99,000 muertes por infecciones adquiridas por bacterias intrahospitalarias resistentes y el costo de los cuidados médicos asociados a ellas, oscila entre 21 y 34 billones de dólares americanos anualmente. Este es un problema que se extiende alrededor del mundo, en Rusia el 86.3% de los hogares utilizan indiscriminadamente antimicrobianos; en Tanzania, África Sub-Sahariana, el

número de muertes por bacterias resistentes a los antimicrobianos, duplica al número de muertes por malaria (*World Economic Forum*, 2013). En América Latina, las cepas bacterianas más peligrosas y resistentes han sido denominadas ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Pimienta-Rodriguez, 2013).

En Perú, el uso irracional de los antimicrobianos, ha derivado en la emergencia y diseminación de microorganismos que son resistentes a drogas de primera línea, baratas y efectivas. Este patrón se cumple en enfermedades diarreicas, meningocólicas, en las infecciones del tracto respiratorio, transmisión sexual y las infecciones intrahospitalarias (INS, 2007). En nuestro país, los antimicrobianos representan el 11% del consumo total de fármacos, ocasionando un gasto de más de 65 millones de dólares, afectando principalmente, la economía de los hogares, ya que la resistencia de las bacterias a los antimicrobianos, incrementa el costo de la atención sanitaria, lo que conlleva a que los enfermos prolonguen por más tiempo su permanencia en los hospitales y requieren de cuidados más intensivos. (INS, 2012).

El fracaso en el tratamiento de una infección producida por una bacteria resistente, es un evento con proyecciones de salud pública, económica y ética. Además, el aumento de infecciones severas producidas por ellas, le agrega también una dimensión social a este problema. Esta dimensión social y pública, también está influida por la globalización de la resistencia a los antimicrobianos, dada la habilidad de las bacterias resistentes para diseminarse extensivamente a través de las poblaciones humanas, animales, vegetales y del medio ambiente, sin respetar límites geográficos ni políticos. (Cabello, 2003). Cabello (2006), también destaca que la comercialización mundial de productos alimenticios, potencialmente contaminados con residuos de antibióticos, también agrega dimensiones económicas y éticas a este fenómeno.

La necesidad de la búsqueda de un nuevo método para combatir patologías bacterianas es doble. Por un lado, las bacterias cada día más resistentes a los antimicrobianos, resultan más difíciles de combatir; mientras que por otro

lado, la especificidad de los antimicrobianos es prácticamente inexistente, atacando no solo a los patógenos del organismo sino también a toda la bacterioflora normal, debilitándolo y facilitando otra posible infección por parte de otro agente patógeno.

Por lo anteriormente expuesto, muchos de los problemas de las enfermedades se originan por el manejo inadecuado de los antibióticos y otros agentes antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades bacterianas, por lo que en la actualidad las investigaciones se han encaminado al desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas para impedir o disminuir el desarrollo de enfermedades. Una estrategia que nuevamente se ha retomado, es el empleo de los bacteriófagos, como una vía alterna para combatir a las bacterias patógenas.

Los bacteriófagos también llamados fagos, son parásitos naturales de las bacterias y son considerados agentes para el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a los antimicrobianos desde hace 100 años. Esta capacidad bactericida de los fagos se ha usado para tratar infecciones en seres humanos ya sea como complemento o alternativa a la terapia antibiótica (Alisky *et al.*, 1998; Matsuzaki *et al.*, 2005; Kysela & Turner, 2007), siendo sólo los fagos líticos (también conocidos como fagos virulentos) una buena opción para el desarrollo de preparaciones de fagos terapéuticos (Borysowski & Gorski, 2008).

Los bacteriófagos también han sido empleados como agentes de control biológico natural en problemas ambientales, por ejemplo, para el tratamiento de aguas residuales (Cartmell, *et al.*, 2005; Periasamy, & Sundaran, 2013) y el tratamiento de lodos (Sánchez, 2012).

1.2. Formulación del Problema

¿Cómo aislar y caracterizar un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis*?

1.3. Justificación teórica de la Investigación

Desde que el surgimiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos se convirtió en un problema mundial y existiendo la necesidad de método nuevo y efectivo para controlar patógenos (Barrow & Soothill, 1997; Reacher *et al.*, 2000; Goossens *et al.*, 2005), una alternativa potencial para tratar de revertir este problema, es el uso de bacteriófagos o fagos, los cuales son virus naturales que infectan y lisan bacterias de manera especie- específica, atacando solamente a la bacteria huésped sin afectar la microflora normal. (Segundo, *et al.*, 2010). La aplicación práctica de los bacteriófagos en el tratamiento de las infecciones bacterianas (Harper & Morales, 2012), ocasionada especialmente por bacterias resistentes a los antimicrobianos, es la Fagoterapia (Chhibber & Kumari, 2012).

Goodridge y Abedon (2003), consideran que las principales ventajas inherentes a la terapia de fagos sobre los antibióticos, son su abundancia en el medio ambiente y su característica de especificidad hacia las células bacterianas sin afectar la flora normal, a diferencia del amplio espectro de los antibióticos.

Los fagos están evolutivamente seleccionados para infectar una sola especie bacteriana, muchas veces a una concreta, es por ello de la ausencia de efectos secundarios, la ubicuidad y la diversidad de los bacteriófagos en el medio ambiente, significa la presencia de numerosos bacteriófagos alternativos, con diferentes rangos de huéspedes, que atacan a diversas células bacterianas y que se encuentran en el medio ambiente.

Al ser los fagos específicos para determinadas cepas bacterianas no tienen efectos colaterales como los antibióticos (alergias u otro tipo de contraindicaciones) además pueden ser aislados en pocos días, lo cual es una ventaja sobre los antibióticos que tardan más tiempo en desarrollarse (Makarov, 2011) y cuya producción es bastante costosa y en la que actualmente la búsqueda de nuevos antibióticos es difícil, mientras que la

naturaleza constituye una fuente virtualmente inagotable de fagos. (García & López, 2002).

La capacidad bactericida de los bacteriófagos, se ha empleado en el tratamiento de infecciones humanas como un complemento a los antibióticos o una alternativa a la terapia antibiótica (Kysela & Turner, 2007). También se ha empleado su uso en aves (Atterbury, *et al.*, 2007; Goode, *et al.*, 2003), peces (Park *et al.*, 2000), plantas (Jones *et al.*, 2007), alimentos (Maura & Debarbieux, 2011) en la erradicación de *biofilms* (Curtin & Donlan, 2006) y en lodos (Sánchez, 2012)

Como resultado hay un renovado interés en la aplicación de los bacteriófagos, los que frente a los avances tecnológicos actuales que permiten la preparación de fagos purificados y un mejor conocimiento molecular de los mismos, han llevado a reconsiderar los trabajos realizados en los países de la antigua Unión Soviética (Sulakvelidze, *et al.*, 2001) y a proponer su uso, como una auténtica alternativa terapéutica.

Por lo expuesto anteriormente, esta investigación tiene como fin el aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos específicos a *Vibrio fluvialis*, el cual nos brindará las bases para evaluar fagos con potencial para controlar a esta bacteria patógena oportunista y la futura aplicación de los bacteriófagos como una auténtica vía alternativa a los antibióticos para combatir a las bacterias patógenas multiresistentes.

1.4. Justificación práctica de la Investigación

La presente investigación permitirá el desarrollo de una metodología para el aislamiento y caracterización de bacteriófagos de origen marino para especies potencialmente patógenas de peces en cultivo.

Para el caso de la acuicultura, en el Instituto del Mar del Perú (IMARPE), institución de investigación encargada de realizar investigaciones científicas y tecnológicas de los recursos vivos del mar y de las aguas continentales,

una de las líneas de investigación que se viene desarrollando en la Dirección de Investigaciones en Acuicultura, es la de emplear a los bacteriófagos como controladores de bacterias patógenas que afectan a los peces en cultivo, es por ello que existe la necesidad de contar con un banco de fagos con potencial para controlar bacterias y poder aplicarlos como herramientas biotecnológicas en el control de infecciones en animales acuáticos en cautiverio.

El crecimiento actual de la producción acuícola, es paralelo al creciente número de brotes de enfermedades afectando la producción, la rentabilidad y la sostenibilidad de esta industria en todo el mundo. Entre los grupos de microorganismos patógenos, la vibriosis, es la causante de las mayores pérdidas económicas y responsable de la mortalidad (masiva) de organismos acuáticos en cultivo.

Dentro del Plan Nacional de Acuicultura, el “lenguado” *Paralichthys adspersus* y la “chita” *Anisotremus scapularis*, ambos recursos cultivados en el IMARPE, son consideradas especies priorizadas para el desarrollo de la acuicultura marina en el país y son los *Vibrios* las especies con potencial patogénico que las afectan, ocasionando mortalidades, especialmente en las primeras etapas de su desarrollo, de allí la importancia de aislar bacteriófagos contra especies de este género.

1.5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1. Objetivo General

- Aislar y caracterizar un bacteriófago lítico específico para *Vibrio fluvialis*.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Aislar bacteriófagos procedentes de agua de mar
- Purificar, propagar y determinar el título de los bacteriófagos aislados
- Caracterizar por microscopía electrónica los bacteriófagos aislados.
- Caracterizar biológicamente los bacteriófagos aislados
 - Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago.
 - Efecto de la exposición a la luz UV
 - Sensibilidad del fago al cloroformo
 - Resistencia del fago al pH
 - Determinación del rango de hospederos
 - Curva de un paso

2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación

Las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las más importantes causas de muerte en los humanos. Durante mucho tiempo, pareció que los antibióticos eran omnipotentes y que el tratamiento de las bacterias patógenas con ellos, eliminaría las enfermedades infecciosas; sin embargo, las bacterias se han tornado multiresistentes por el uso persistente a una gama de antibióticos de amplio espectro por lo que estas “drogas milagrosas”, no son efectivas como lo fueron hace más medio siglo atrás, constituyéndose en un grave problema de salud mundial (Golkar, 2014).

La aparición de múltiples bacterias resistentes a los fármacos, ha suscitado el interés en alternativas a los antimicrobianos convencionales. Una de las posibles opciones de reemplazo de los antimicrobianos, es el uso de bacteriófagos como agentes antimicrobianos. Los bacteriófagos son las entidades más abundantes sobre la tierra y son los enemigos naturales de las bacterias y su empleo en el tratamiento de infecciones bacterianas, tratamiento conocido como fagoterapia, tienen una historia mucha más antigua que los antibióticos.

2.2. Antecedentes de la investigación

A pesar que *Vibrio fluvialis* es considerada una bacteria patógena oportunista emergente que afecta a humanos por el incremento de brotes diarreicos y de casos extraintestinales esporádicos, durante el desarrollo de la presente investigación, sólo se encontró un antecedente sobre bacteriófagos específicos, el cual fue reportado por Suthienkul (1993), quien aisló 6 bacteriófagos líticos estables a partir de 44 muestras de agua superficiales en Tailandia y Japón con la finalidad de desarrollar un método de tipificación bacteriana para uso epidemiológico y ecológico por medio de fagos específicos a *V. fluvialis*.

Considerando que *V. fluvialis* también ocasiona enfermedades en animales acuáticos, Ning (1996), realizó la caracterización biológica del bacteriófago NP – (13) específico para *V. fluvialis* aislado de agua de mar donde reportó 95% de supervivencia del fago a 50°C por 30 minutos y de 45% por 30 minutos a 60°C. Igualmente, Yang (1997), quien a partir de 58 muestras de zonas con impétigo en *Haliotis discus hannai* “abalón disco”, aisló el bacteriófago VP9, encontrándose 0% de supervivencia a 65 °C y alta estabilidad en el rango de pH 6 a 12. Finalmente, Li *et al* (1999), aislaron, purificaron y propagaron un bacteriófago de *V. fluvialis* –II. El fago fue aislado de 12 muestras de agua y fue utilizado para controlar la enfermedad de la pústula en el abalón *Haliotis discus hannai*.

A nivel de Perú no hay reportes del aislamiento de bacteriófago específicos a *Vibrio fluvialis*, pero sí trabajos en esta línea de investigación.

Talledo *et al*, (2003), aislaron a partir de agua de mar de la costa de Lima, un bacteriófago temperado específico a *Vibrio cholerae* perteneciente a la familia Myxoviridae con un tamaño de genoma de 29kpb.

Tamariz, *et al*, (2014), evaluaron la actividad de los bacteriófagos frente a infecciones localizadas y sistémicas producidas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), concluyendo que la aplicación de un cóctel de bacteriófagos y monoterapia a diversas dosis resultó efectiva para la prevención y el tratamiento de infecciones localizadas por MRSA.

Fernández (2016), evaluó la adición de diferentes dosis del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus* en unidades experimentales y diferentes tiempos de adición de la dosis con la que se obtuvo una mayor supervivencia en *Artemia franciscana*.

Meza (2016), en esta investigación se buscó encontrar bacteriófagos líticos específicos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* como una terapia alternativa al de uso de antibióticos (Fagoterapia).

Fernández, *et al.*, (2017) caracterizó un bacteriófago específico a *Vibrio alginolyticus* concluyendo que el fago Va1 es un buen candidato para realizar pruebas en fagoterapia, dado que presenta un elevado tamaño de explosión y un periodo de latencia corto.

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Características del género *Vibrio* sp

El género *Vibrio* pertenece a la familia Vibrionaceae, familia que a su vez forma parte del orden Vibrionales. Esta familia incluye los géneros: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia* y *Allomonas*, *Catenococcus*, *Listonella*, (Chimetto *et al.*, 2011) (Garrity *et al.*, 2004).

Algunos miembros de esta familia son patógenos importantes en humanos y animales (Kita-Tsukamoto, 1993), así como en relaciones simbióticas con peces luminiscentes y cefalópodos (Macián *et al.*, 2004)

En 1854, el médico italiano Filippo Pacini (1812-1883), descubrió la primera especie de *Vibrio*, el *Vibrio cholerae*, agente causante del Cólera, durante un brote de esta enfermedad en Florencia. (Thompson, *et al.*, 2004).

El género *Vibrio* fue uno de los primeros grupos bacterianos en ser reconocidos y descritos taxonómicamente en la naturaleza. Son el grupo más dominante de bacterias heterotróficas en el medio marino y se encuentran ampliamente distribuidas en las aguas marinas costeras y / o aguas salobres. (Ortigosa, 1994). Los miembros de esta familia predominan en la flora bacteriana del agua de mar, plancton y la flora intestinal de peces marinos.

Son bacilos Gram negativos, cortos, rectos o curvados, con tendencia al polimorfismo, pudiendo observarse formas cocobacilares e incluso cocoides. Son bacterias heterótrofas, fermentativas, oxidasa y catalasa positivas, generalmente móviles por medio de un simple flagelo polar cuando crecen en medio líquido y usualmente sensible al agente Vibriostático 0/129 (2,4 diamino-6,7diisopropilpteridina). Crecen en agar marino o en el medio selectivo TCBS y son incubadas a 35 °C en atmósfera aerobia y anaerobia,

además de fermentar la glucosa sin producción de gas. (Thompson *et al.*, 2004). Toleran un amplio rango de salinidad que va de 2,0 a 2,5% (peso/volumen), algunas especies halófilas requieren al menos una concentración del 0.5% de NaCl en el medio para crecer, mientras que *Vibrio cholerae* y *Vibrio mimicus* pueden crecer con concentraciones mínimas de sal. (Farmer & Hickman-Brenner, 2006)

Vibrio cholerae, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, son especies patógenas para el ser humano y últimamente *Vibrio fluvialis* está considerado como patógeno emergente. (Ramamurthy, 2014); mientras que *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio mimicus*, *Photobacterium damsela*, sub especie *damselae* y también *Vibrio fluvialis*, ocasionan enfermedades tanto en animales acuáticos como en humanos. *Vibrio anguillarum* y *Vibrio tapetis* incluye patógenos de vertebrados acuáticos o invertebrados (Garrity *et al.*, 2004; Austin, 2009; Yan, *et al* 2009).

A finales de los años 70, un grupo de Vibrios no identificados fueron aislados en Bangladesh a partir de infantes, niños y jóvenes adultos con diarreas severas (Huq *et al.*, 1980). En Inglaterra estos Vibrios fueron designados como el grupo F (Furniss *et al*, 1977) y en Estados Unidos (Huq *et al.*, 1980), como el grupo EF6. Estudios taxonómicos concluyeron que estos organismos correspondían a una nueva especie, la que fue denominada como *Vibrio fluvialis* (Lee, *et al.*, 1981; Chakraborty, *et al.*, 2005).

Vibrio fluvialis se distribuye a nivel mundial (McNicol *et al.*, 1980; Thekdi *et al.*, 1990) y no sólo ha sido aislado de muestras de casos diarreicos en humanos (Huq *et al.*, 1980), sino también de ambientes marinos y en estuarios (Lee *et al*, 1981; Morris, 1985.). Existen reportes de intoxicación alimentaria especialmente por consumir bivalvos crudos (Thekdi *et al.*, 1990) (Levine & Griffin, 1993) y también de casos infecciosos extra intestinales como otitis (Chen, 2012) en SIDA (Hodge *et al.*, 1995), celulitis y cerebritis (Huang & Hsu, 2005), peritonitis (Ratnaraja *et al.*, 2005), infecciones oculares (Penland *et al.*, 2000), en sarro dental (Tamilselvan *et al.*, 2004) y

la infección por inoculación de la bacteria por una picadura de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, empleada en terapia medicinal (Varghese, *et al.*, 1996). Considerando el aumento de brotes de diarreas y algunos casos esporádicos extra intestinales, *V. fluvialis* es considerado un patógeno humano emergente (Ramamurthy, *et al.*, 2014).

Esta bacteria también se ha visto implicada en ocasionar patologías en organismos marinos en cultivo como el *Pleuronectes platessa* “platija” pez plano de la familia Pleuronectidae donde se reportó por primera vez que asociado con otras especies de *Vibrio*, produjo mortandad en alevines (Pedersen *et al.*, 1999).

Vibrio fluvialis es también patógeno secundario de peces de ornato, como *Carassius auratus*, a quienes se les infectó experimentalmente inyectando, vía intramuscular, diferentes dosis infectivas de la bacteria con la finalidad de probar la capacidad de ésta, para producir infección en organismos acuáticos. Se estableció la relación etiológica entre *V. fluvialis* y su huésped, mostrando un cuadro clínico caracterizado como respuesta arquetípica parecida a una dermonecrosis ulcerativa con septicemia aguda. (Negrete *et al.*, 2003). También se ha visto implicado en ocasionar a la “langosta americana” *Homarus americanus* la “enfermedad blanda de la langosta” (Tall *et al.*, 2003) y la enfermedad de la pústula en el abalón *Haliotis discus hannai* Ino (Li *et al.*, 1999). En 1993, se reportó en China a las bacterias *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio fluvialis* como los agentes causales de la septicemia que afectó a la “carpa dorada” *Carassius auratus*, “carpa plateada” *Hypophthalmichthys molitrix*, “carpa negra” *Mylopharyngodon piceus* y también a los moluscos bivalvos *Hyriopsis cumingii* y *Cristaria plicata* (Li *et al.*, 2006). Yan, *et al.* (2009), reportó a *V. fluvialis* ser el agente patógeno causante de mortalidad de *Epinephelus awoara*, pez altamente cultivado al sur de China, ocasionando grandes pérdidas económicas.

Por lo expuesto, *Vibrio fluvialis*, representa una amenaza económica significativa para la acuicultura por ser patógena para organismos marinos en cultivo como peces y langostas (Liang *et al.*, 2013).

Vibrio fluvialis son bacilos Gram negativos de forma curva, que miden entre 2 y 3 μm de largo y están dotados de un único flagelo polar que les permite una elevada movilidad. Son halófilos, oxidasa, catalasa y nitrato positivo, fermentan la D-glucosa y otros hidratos de carbono con la producción de ácido y gas; contienen 50% de guanina-citosina en su ADN.

2.3.2. Bacteriófagos

Los bacteriófagos se definen como virus que específicamente infectan y se reproducen en células procariontes o bacterias que se encuentran metabólicamente activas (Díaz, 2006). Son las estructuras biológicas con ácidos nucleicos más abundantes de la biósfera por lo que han sido llamados “la forma de vida más abundante y ubicua en la tierra”. Se calcula que existen 1×10^{31} fagos por litro de agua de mar, lo que representa un excelente mecanismo de control de las bacterias marinas, ya que se produce un equilibrio entre las bacterias que se multiplican y los fagos que destruyen una parte de esa población bacteriana. (Ronda, *et al.* 2003)

Los bacteriófagos fueron observados por primera vez en 1896 cuando Ernest Hankin un bacteriólogo británico, reportó que el agua de los ríos Ganges y Jumna, en la India, tenían una acción bactericida marcada y que al pasar a través de un fino filtro de porcelana no perdía esta propiedad. (Sulakvelidze, 2001). El especulaba que la actividad se perdía si se hervía el agua. Hankin estudió este efecto, en particular sobre *Vibrio cholerae*, y sugirió que la sustancia responsable, hacía que la epidemia del cólera no se expandiera si se ingería esta agua (Sharp, 2001)

Dos años después Gamaleya un bacteriólogo ruso observó un fenómeno similar, sin embargo no fue hasta 1915, en el que los virus bacterianos fueron descubiertos en forma independiente por el bacteriólogo británico, Frederick W. Twort, y en 1917 y por el francés Félix d'Hérelle en Francia. (Sharp, 2001; Sulakvelidze, 2001; Summers, 2001). Tanto D'Hérelle en 1917 como Twort en 1915, fueron capaces de demostrar placas de lisis que se

producían cuando se añadían extractos obtenidos de aguas fecales a cultivos bacterianos apropiados (García & López, 2002).

Frederick W. Twort, describió a los fagos como agentes que producían una “transformación vidriosa” en colonias bacterianas. Todos estos agentes infecciosos podían distinguirse fácilmente de las bacterias por el hecho de pasar a través de filtros que retenían a estas últimas. Por varias razones incluyendo dificultades financieras, Twort no pudo continuar sus hallazgos. (Summers, 2001).

La descripción por Twort pasó relativamente desapercibida hasta que en 1917, el microbiólogo franco canadiense Félix d’Hérelle publicó sus observaciones sobre agentes filtrables presentes en las heces de pacientes que al incubarse podían provocar la lisis de bacilos entéricos. Estos estudios se realizaron en soldados afectados por diarreas disentericas de origen bacteriano en un hospital en París. D’Hérelle los llamó “bacteriófagos o come bacterias”. Ahora se llaman indistintamente virus bacterianos, bacteriófagos o simplemente fagos. (Herrero, 2013).

D’Herelle, fue el pionero en reportar que los bacteriófagos tenían el potencial de matar a las bacterias causantes de enfermedades en humanos, plantas o animales en estadios tempranos de la enfermedad y empleó los fagos como agentes terapéuticos antes de la era de los antibióticos. (Espejo, 1973, Duckworth, 1976, Sulakvelidze *et al.*, 2001, García & López, 2002 & Abedon, *et al.*, 2011) y describió el uso de los fagos en medicina humana, para curar y prevenir cerca de una docena de enfermedades, incluyendo la disentería, fiebre tifoidea, cólera, peste bubónica y heridas infectadas. También describió el empleo de fagos para inmunizar y detener epidemias de tifoidea aviar, septicemia hemorrágica del búfalo, peste bubónica, disentería y enfermedades del gusano de seda. (Sulakvelidze, 2001; Summers, 2001).

Las primeras investigaciones con fagos estuvieron relacionadas con la definición de la naturaleza de estas partículas; sin embargo, su capacidad de provocar la lisis celular de microorganismos patógenos constituyó la base

de muchos trabajos encaminados a su uso terapéutico. La terapia con bacteriófagos se inició en 1921 por Bruynoghe y Maisin (citado por Vispo y Punchades, 2001, p.1.) en el tratamiento de infecciones por estafilococos. Aunque los resultados fueron muy promisorios se hizo muy poco en los años sucesivos. La idea de la aplicación terapéutica de los bacteriófagos se abandonó después de la introducción de las sulfonamidas en la práctica médica y, con ellas, de los antibióticos. A pesar de esto, la acción lítica de los bacteriófagos in vitro, permitió a los investigadores usar fagos específicos para diferenciar entre varias especies de bacterias y se desarrollaron métodos de diferenciación que son muy útiles actualmente en las investigaciones epidemiológicas (Vispo & Punchades, 2001).

A partir de la década de 1930, Salvador Luria y Max Delbruck y otros más, utilizaron los fagos como modelo para investigar diversos aspectos de la virología general como la estructura de los viriones, la morfogénesis, la genética y la replicación. (Herrero, 2013).

Aún después del advenimiento y propagación de los antibióticos, en EEUU y Europa, se continuó, aunque en menor escala, con el uso y producción de fagos para empleo terapéutico. El Instituto Pasteur de Francia produjo preparaciones de fagos contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli* y *Serratia* hasta 1974. Estos fagos fueron usados principalmente contra infecciones de la piel, septicemia, osteomielitis, infecciones por heridas, del tracto urinario, el oído medio y de los senos nasales (Gill & Hyman, 2010).

Los lisados de fagos estafilocócicos (LFE) fueron usados en los Estados Unidos de América en la preparación de vacunas humanas y veterinarias. En 1959, se completaron los ensayos clínicos y se permitió su empleo en humanos, ya sea, por vía intranasal, tópica, oral, subcutánea e intravenosa. Estos ensayos clínicos demostraron la eficacia de la terapia con fagos, en los cuales 607 pacientes, que no respondían a tratamientos convencionales, fueron tratados satisfactoriamente con fagos.

Además, no se reportaron efectos secundarios. Desafortunadamente, debido a presiones reguladoras, la producción de LFE para la terapia en

humanos fue suspendida en los años 90 y actualmente solo se comercializan los LFE con aplicaciones veterinarias (Pimienta-Rodríguez, 2013).

En cambio, en la URSS después de la Segunda Guerra Mundial y actualmente en Rusia, la terapia con fagos se inició y se sigue utilizando. Uno de los institutos más conocidos por estudiar y producir preparaciones de fagos terapéuticos es el Instituto Tbilisi, en la República de Georgia, el cual fue fundado en 1923 por George Eliava y Félix d'Herelle.

Desde su fundación hasta los años 90, el Instituto suplió a toda la URSS con preparaciones de fagos terapéuticos. Este Instituto ha producido fagos para el tratamiento y profilaxis de infecciones sépticas purulentas e intestinales. Las preparaciones de fagos han sido aplicadas por vía oral (líquidas o tabletas), localizadas (en tampones, enjuagues y cremas), rectal, aerosol, por nebulización y en forma endovenosa (Kuteladze & Adamia, 2010).

Después de la caída de la Unión Soviética y la inestabilidad política en Georgia, se inició el declive del Instituto por falta de medios económicos. Esta situación pudo ser revertida y en el año 2003, los científicos del Instituto Eliava crearon la compañía *Phage Therapy Center*, la que posteriormente fue adquirida por una compañía americana llamada *Phage International* y esta compañía en el año 2005 abrió las puertas de una clínica en Tbilisi (Pimienta-Rodríguez, 2013).

2.3.3. Propiedades de los bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos como todos los virus, son parásitos intracelulares obligados que requieren de la maquinaria metabólica de su bacteria huésped para su reproducción. La interacción de los fagos con sus bacterias huéspedes, es similar a la de los virus animales con sus células huéspedes. (Duckworth, *et al.* 2002).

Los fagos se presentan en todos los ecosistemas donde existen bacterias en altas concentraciones, como el agua, aguas residuales muestras de tierra o cieno, aire (Segundo, *et al.* 2010), alimentos (García, *et al.* 2010) en las

profundidades del mar, lagos alcalinos (pH = 10), salinas (ambientes diez veces más salados que el océano), aguas termales ácidas (a 80 ° C de temperatura y con pH igual 3,0), lagos polares , en el subsuelo terrestre (a profundidades mayores de 2000 metros de profundidad) (Breitbart y Rohwer, 2005) y en el lugar donde se encuentre su bacteria huésped (Kutateladze & Adamia, 2010). En el ser humano, se han aislado numerosos fagos en el contenido intestinal, orina y la cavidad oral (Borie & Navarro, 2007).

2.3.4. Estructura

Los bacteriófagos están compuestos fundamentalmente de material genético y proteínas. Su genoma puede componerse de ADN o de ARN el cual puede ser de cadena doble o de una sola cadena, circular o lineal.

El material genético contiene información específica y tiene el potencial operacional para modificar la maquinaria de la célula infectada, utilizándola a su favor para llevar a cabo la producción de los componentes de las nuevas partículas virales (Díaz, 2006).

El ácido nucleico está protegido por una cubierta de proteínas denominada cápside. La estructura de los fagos, está determinada por sus proteínas de envoltura (o proteínas estructurales) cuya función principal es la de proteger al material genético fágico; estas proteínas pueden además, proveer al fago de: cuello, cola, fibras caudales, laminas basales y/o espículas (Vispo y Puchades, 2001). La forma en la que se arreglan las proteínas alrededor del material genético del virus, define la complejidad estructural y la forma del mismo, de tal modo que existen fagos icosaédricos, helicoidales o filamentosos. (Clark y March, 2006). (Figura 1).

Al unirse los fagos a la bacteria huésped, el cromosoma pasa a través de la cola hueca e ingresa a la bacteria, donde será capaz de replicarse, formar sus proteínas específicas para finalmente llevar a cabo la formación de las partículas o su descendencia.

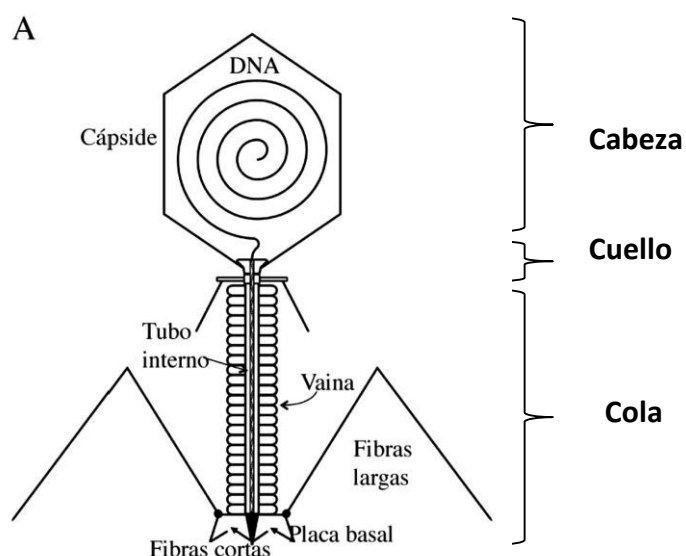


Figura 1. Estructuras proteicas que componen un bacteriófago.

Fuente. Leiman *et al.*, 2010.

2.3.5. Clasificación

Las primeras clasificaciones de los bacteriófagos fueron realizadas por Bradley en 1967, quien los agrupó en cinco grupos de acuerdo a la morfología más contrastantes de los fagos. El grupo A, conformado por los fagos con cola contráctil y doble hebra de ADN. El grupo B, por los fagos que poseían una cola larga pero no contráctil y doble hebra de ADN. El grupo C, por los fagos de cola corta y no contráctil y doble hebra de ADN. Los grupos D y E que posteriormente fueron un solo grupo, conformados por bacteriófagos sin cola y con capsómero tanto largo y corto y de una hebra de ARN. Finalmente, el grupo F o el de los fagos filamentosos y de una hebra de ADN. (Tabla 1) (Figura 2). (Bradley, 1967).

Tabla 1. Grupos morfológicos básicos de bacteriófagos y tipo de ácido nucleico.

GRUPO	DESCRIPCIÓN	TIPO DE ACIDO NUCLEICO
A	Cola contráctil	Doble hebra de ADN
B	Cola larga no contráctil	Doble hebra de ADN
C	Cola corta no contráctil	Doble hebra de ADN
D	Sin cola, capsómero grandes	Una hebra de ARN
E	Sin cola, capsómero corta	Una hebra de ARN
F	Sin cabeza, filamentosos	Una hebra de ADN

Fuente: (Bradley, 1967).

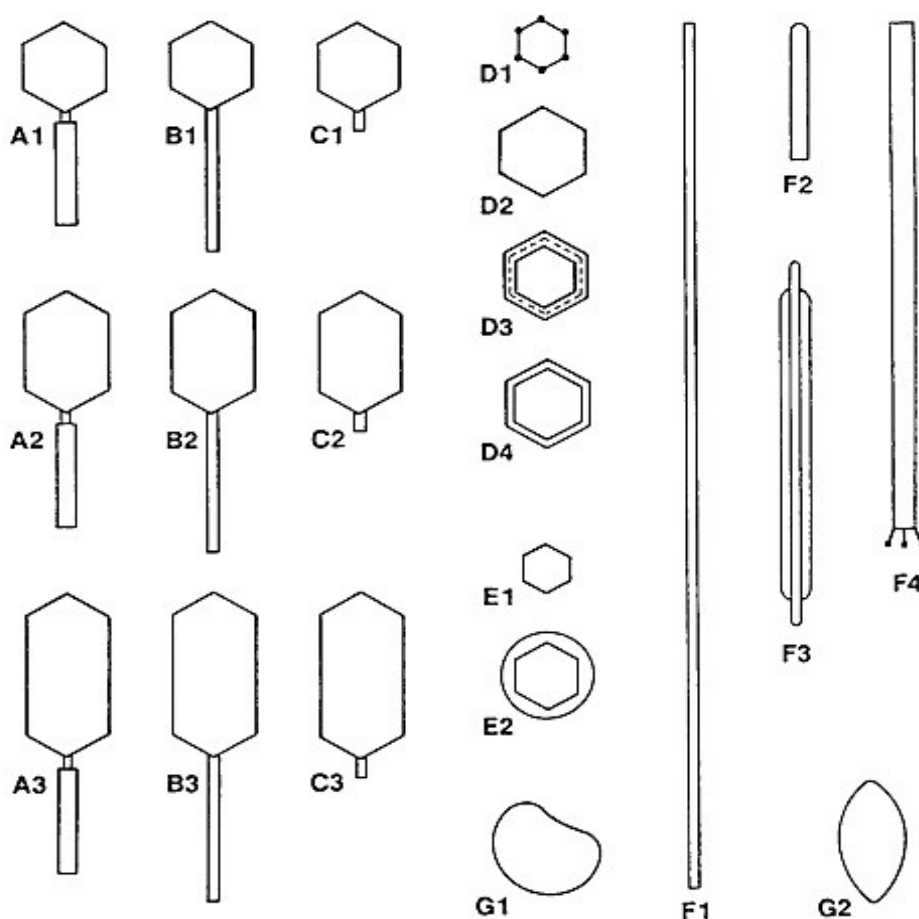


Figura 2. Tipos morfológicos básicos de bacteriófagos.

Fuente: Ackermann, 2001

El desarrollo tecnológico en el campo de la Microscopía Electrónica de Transmisión y Cristalografía de Rayos X, ha permitido conocer las

características morfológicas más finas de los virus, las que a su vez, con el tipo de ácido nucleico y con el rango de infección son esenciales para su clasificación (Calendar, 2006). Actualmente para los virus se reconoce una jerarquía de especie, género, familia y orden (Cann, 2005).

De acuerdo a la clasificación otorgada por el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), organización que fue creada en 1966 y dedicada a la clasificación de los virus, los fagos se clasifican en 14 familias las que se basan en su forma, tamaño, tipo de ácido nucleico y presencia o ausencia de envolturas o lípidos en su estructura. Muchos de ellos pertenecen al orden Caudovirales (5360 de 5568 reportados a la fecha) con una cabeza icosaédrica, cola y ADN de doble cadena (Ackerman, 2007-2009) (Tabla 2) (Figura 3).

Según las características morfológicas de la cola, están clasificados en tres familias, caracterizadas por ser fagos sin membrana lipídicas, compuestos de una cabeza con simetría icosaédrica: *Myxoviridae* (cola contráctil), *Siphoviridae* (cola larga no contráctil) y *Podoviridae* (cola extremadamente corta). El resto de fagos son cúbicos, filamentosos o fagos pleomórficos con ADN de doble cadena (ds DNA por sus siglas en inglés) ADN de una sola cadena (ssDNA por sus siglas en inglés), ARN de doble cadena o ARN de cadena simple (García *et al.*, 2010). Algunas estructuras como cuello, collar, cubierta de la cola, plataforma basal, espículas y fibras o apéndices son características de este orden. El genoma de los Caudovirales es una molécula de doble hebra de ADN no segmentado (Ackerman, 2007). Para los actinofagos (fagos que infectan a los actinomicetales) tienen características tales como cabezas en forma icosaédrica y largas colas no contráctiles que los ubican en la familia *Siphoviridae* (Thomas *et al.*, 2002).

Tabla 2. Morfología, ácido nucleico y familia de los bacteriófagos. Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado.

MORFOLOGÍA	FORMA	ÁCIDO NUCLEICO	FAMILIA	PARTICULARIDADES
A ₁ A A ₃	FAGOS CON COLA	ADN DC, L	MYOVIRIDAE	COLA CONTRÁCTIL
B ₁ A B ₃			SIPHOVIRIDAE	COLA LARGA, NO CONTRÁCTIL
C ₁ A C ₃			PODOVIRIDAE	COLA CORTA
D ₁	FAGOS POLIÉDRICOS	ADN SC, C	MICROVIRIDAE	CAPSÓMEROS SOBRESALIENTES
D ₃		ADN DC, C, S	CORTICOVIRIDAE	CÁPSIDE COMPLEJA, LÍPIDOS
D ₄		ADN DC, L	TECTIVIRIDAE	VESÍCULA LIPÍDICA, PSEUDOCOLA
E ₁		ARN SC, L	LEVIVIRIDAE	
E ₂		ARN DC, L, SEG.	LEVIVIRIDAE	CUBIERTA LIPÍDICA
F ₁	FAGOS FILAMENTOSOS	ADN SC, C	INOVIRIDAE	A- FILAMENTOS LARGOS
F ₂				B- BASTONES CORTOS
F ₃		ADN DC, L	LIPOTHRIVIRIDAE	CUBIERTA LIPÍDICA
F ₄		ADN DC, L	RUDIVIRIDAE	SIMILAR AL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO
G ₁	FAGOS PLEOMÓRFICOS	ADN DC, C, S	PLASMAVIRIDAE	CUBIERTA LIPÍDICA, SIN CÁPSIDE
G ₂		ADN DC, C, S	FUSELLOVIRIDAE	CUBIERTA LIPÍDICA, SIN CÁPSIDE, EN FORMA DE LIMÓN

Fuente: Ackerman (2007)

2.3.6. Ciclo de Vida

En función de su ciclo de vida, los fagos se clasifican en dos tipos: Líticos obligados (Ciclo Lítico) y Atemperados (Ciclo Lisogénico). (Figura 3).

El fago que se replica en el interior de la bacteria y el proceso finaliza con la lisis del huésped inducida por el fago con la liberación de la progenie, corresponde al ciclo lítico; mientras el fago temperado o avirulento en los que el ADN del fago se integra al cromosoma de la bacteria y se replica

en el interior de la célula, pero no hay liberación de viriones y la bacteria huésped se mantiene viable, corresponden al ciclo lisogénico. Estos fagos no siempre permanecen asociados al cromosoma bacteriano sino que pueden escindirse y realizar un ciclo lítico dependiendo de ciertas condiciones del ambiente.

La bacteria huésped que posee el profago, tiene ventajas con respecto a otras bacterias el cual le confiere inmunidad o resistencia a la infección por otros fagos. (Conversión lisogénico)

Indistintamente para que ocurra cualquiera de los dos ciclos de vida, es necesario que ocurra la unión del fago a la bacteria huésped. El reconocimiento y la interacción altamente específica entre la célula huésped y el fago, es un evento al azar y depende de la densidad bacteriana, por lo que a mayor densidad de la bacteria huésped, mayor oportunidad de infección.

El primer paso en este proceso de infección es la **adsorción** del fago a la célula bacteriana a través de receptores específicos que están en la superficie del fago para insertarse en los receptores específicos de la superficie celular bacteriana (Downes & Ito, 2001). La zona de adsorción de los bacteriófagos es complementaria al receptor celular, por lo tanto un determinado virus sólo puede infectar un número limitado de cepas bacterianas que contengan un determinado receptor. (Azeredo & Sutherland, 2008). La naturaleza de los receptores varía de acuerdo con el fago: proteínas, y lipopolisacáridos de la pared celular, ácidos teicoicos, flagelos y pili poder ser receptores (Shurnik & Strauch, 2006). Después de la adsorción irreversible, se produce **la inyección del ácido nucleico**, proceso que involucra mecanismos de transferencia específica de ADN o ARN (Kutter & Sulakvelidze, 2005), para lo cual ocurre un cambio configuracional en las proteínas de la placa basal, alguna de las cuales tienen actividad enzimática y producen un poro en la membrana citoplasmática de la célula. La vaina del fago se contrae y el material genético viral ingresa en la célula, mientras que la envoltura proteica queda en el exterior. El siguiente paso es la **replicación del material genético del bacteriófago**, para lo cual una vez inyectado el ácido nucleico el cual

debe tener bases modificadas (glicolización y/o metilación) que eviten la degradación por nucleasas bacterianas, se sintetizan proteínas tempranas las que reparan el poro de la membrana citoplasmática por donde ingresó el genoma viral. Las nucleasas del fago degradan el ADN bacteriano lo que proporciona una fuente de precursores, para evitar la síntesis de ARN y proteínas bacterianas, proporcionando ribosomas para la síntesis de proteínas del fago. Para la **síntesis** de las envolturas proteicas (cápside, vaina, fibras, etc.) son proteínas tardías que se sintetizan después de iniciada la replicación del material genético. La síntesis de cada componente proteico se realiza separadamente. La siguiente etapa, se produce el **ensamble** de todas las proteínas de la envoltura para formar una partícula viral madura capaz de infectar a otra célula cuando se produzca la lisis y liberación de las partículas virales. (Azeredo & Sutherland, 2008). La **lisis celular** se debe a la síntesis de proteínas tardías codificadas en el genoma del bacteriófago, llamadas lisinas que lesionan la membrana citoplasmática y la pared celular (Fischetti, 2008).

El ciclo lisogénico, desarrollado por los fagos temperados comprende prácticamente los mismos pasos del fago lítico, pero después de la penetración, el ácido nucleico del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria por una o varias generaciones sin mayores consecuencias metabólicas para las bacterias, no obstante en este ciclo, el fago tras un proceso de daño grave al material genético de la bacteria, puede salir del cromosoma bacteriano y llevar a cabo un ciclo lítico; este es un modo de infección latente y ocurre con baja frecuencia (Segundo, 2010).

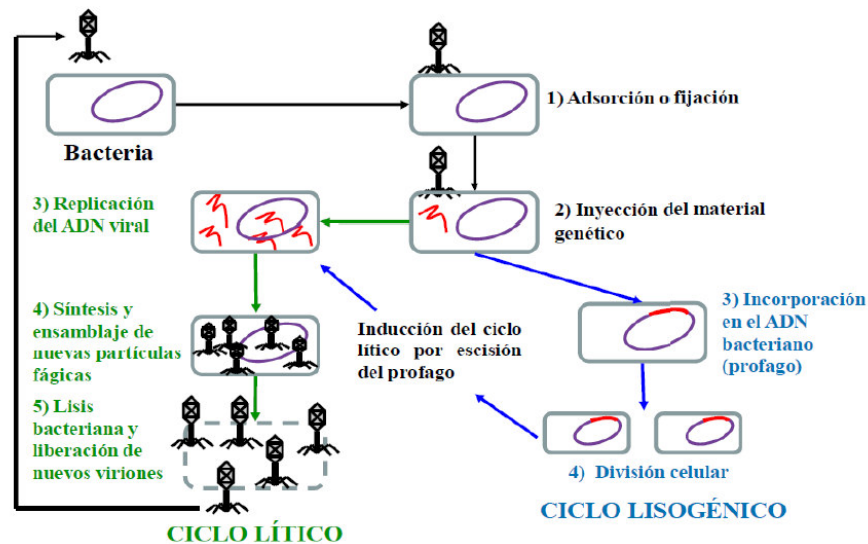


Figura 3. Representación esquemática de las dos alternativas del ciclo replicativo completo del bacteriófago.

Fuente: Gutiérrez *et al.*, 2010

Durante la generación de la progenie fágica, pueden distinguirse los periodos denominados *eclipse* y *latencia*. El primero comprendido desde la inyección del ADN fágico hasta la formación de los viriones maduros en el citoplasma bacteriano; y el segundo comprendido desde la inyección del ADN fágico hasta la liberación al medio de las nuevas partículas fágicas. La progenie fágica desarrollada en el interior de la bacteria infectada se conoce como *tamaño de explosión*. Todos estos parámetros son específicos de cada fago y dependen del huésped y del medio ambiente (Guttman *et al.*, 2005).

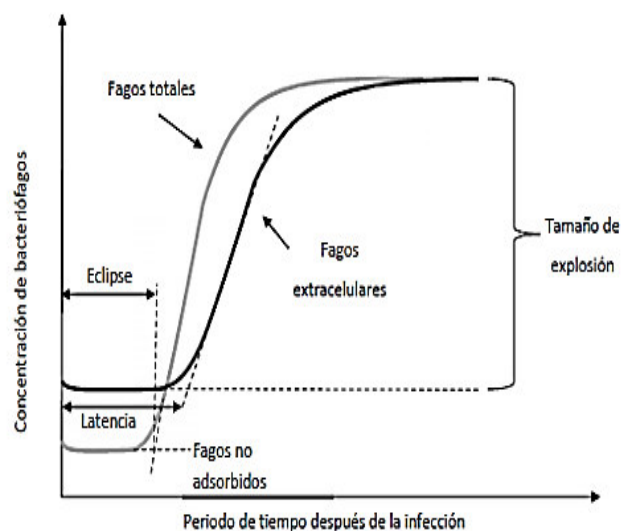


Figura 4. Fases del ciclo lítico de los bacteriófagos.

Fuente: Augusto *et al.*, 2005

3. CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y Diseño de Investigación

El estudio fue observacional descriptivo

3.2. Material biológico

3.2.1. Obtención de bacterias y bacteriófagos

Los bacteriófagos y sus respectivas bacterias huéspedes fueron aislados de las mismas muestras de agua de mar del Terminal Artesanal situado en la bahía del Callao, Provincia Constitucional del Callao (12° 02' 43.6" S) (77° 08' 27.7" O). Se utilizaron frascos estériles de boca ancha y tapa rosca de un litro de capacidad los cuales fueron llenados hasta las $\frac{3}{4}$ de su capacidad dejando un espacio de aire según Protocolo para el Monitoreo de Efluentes y Cuerpo Hídrico Receptor (Ministerio de la Producción, 2013). Las muestras fueron guardadas en cajas térmicas aislantes, conteniendo hielo o material refrigerante para su análisis inmediato.

3.2.2. Obtención de las bacterias hospederas

Para aislar las cepas bacterianas, se filtró el agua de mar utilizando un equipo de filtración con membrana de 0.22 μm de porosidad (Merck Millipore®, Alemania) y las membranas se pre incubaron 25°C por 18 horas en Caldo Tripticasa de Soya (TBS) al que se le adicionó 1% de NaCl. Transcurrido ese tiempo, se tomó una asada del caldo TSB y se sembró por estría por agotamiento en placas Petri con Agar GSP para obtener colonias aisladas las que se incubaron a 25°C por 24 horas.

Se seleccionaron las colonias amarillas, oxidasa positiva y Gram negativas las cuales fueron sembradas en caldo TSB al cual se le adicionó 1% de NaCl. Se aisló una cepa bacteriana la que se denominó Cepa 1 y para conservarse se mantuvo en viales a través de dos métodos. Se fueron resembrando en agar Tripticasa de Soya (TSA) con NaCl 1%, en plano inclinado cada cuatro semanas y guardándose a temperatura ambiente; y por otra parte, se mantuvieron en congelación a -70°C.

Para este último caso, se preparó una suspensión de la bacteria aislada en caldo TSB con NaCl 1% a una concentración de 15×10^8 UFC/ml correspondiente a la Escala 5 de MacFarland Standard. Se tomó 100µl de la bacteria suspensión y se colocó en viales a los que se les agregó glicerol estéril al 10% (100µl por 1 ml de medio) llevándose a congelar inmediatamente a -70°C. (Sánchez & Corrales, 2005).

3.2.3 Identificación fenotípica de la bacteria huésped

Para la identificación fenotípica de la cepa aislada denominada Cepa 1, se realizó mediante el sistema API y se utilizó el kit API® 20E. Este kit permite la identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias, como por ejemplo, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros. Es una galería conformada por 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados de las pruebas bioquímicas tradicionales, los cuales se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios y después de la incubación, se observan cambios de color con o sin adición de reactivos. La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación mediante la tabla de identificación del software apiweb™

El procedimiento consistió primero en la preparación de la galería. Para ello se repartió 5 ml de agua destilada estéril en los tubos de la galería, con la finalidad de crear una atmósfera de humedad. Luego se preparó una suspensión bacteriana homogénea (inóculo) utilizando un tubo de prueba conteniendo solución salina estéril (0,85%) (P/V) al cual se le agregó una colonia bien aislada que se homogenizó hasta igualar la turbidez del tubo 0,5 de la escala estándar de Mac Farland. Con ayuda de una pipeta se procedió a llenar cada una de los tubos de la galería. Para las pruebas CIT, VP y GEL, se llenó el tubo y la cúpula. Para las otras pruebas, se llenó únicamente los tubos (no las cúpulas) y para las pruebas ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, se agregó aceite mineral a las cúpulas, con la finalidad de crear una atmósfera de anaerobiosis. Se cerró la cámara y se incubó a 25 °C por 18 horas. La

lectura de la galería se realizó de acuerdo a la tabla de lectura; y la interpretación para la identificación se obtuvo a partir del perfil numérico. Así mismo, para corroborar su identificación por el sistema API, se procedió a la identificación molecular de la cepa.

3.2.4. Identificación molecular de la cepa huésped

Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento. La identificación molecular de la Cepa 1 fue realizada por el Laboratorio de Genética Molecular del IMARPE, a partir de un cultivo bacteriano. Para ello se realizó la extracción del ADN utilizando el método de CTAB 2X. Se realizó la amplificación parcial de los genes 16S y ARN polimerasa subunidad alfa (*rpoA*), a partir de 2 ng de ADN, 2,5 U de Taq polimerasa HotStart (Qiagen, Switzerland) y 0,1 μ M de primers como concentración final, en una reacción de 15 μ L. La amplificación parcial del gen 16S se realizó utilizando los cebadores 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492R TACGGTTACCTTGTTACGACTT (Lane *et al.*, 1991), mientras que para el gen *rpoA* se utilizaron los cebadores *rpoA*-01-F ATGCAGGGTTCTGTDACAG y *rpoA*-03-R GHGGCCARTTTTCHARRCGC (Thompson *et al.*, 2005). Los amplificados purificados fueron secuenciados para ambas hebras utilizando un analizador genético ABI 3500.

3.2.5. Curva de crecimiento bacteriano

Para esta prueba, la Cepa 1 fue sembrada en 5 ml de Caldo Tripticasa de Soya (TSB) estéril suplementado con NaCl 1% e incubada a 25 °C durante 24 horas. Culminado el tiempo de incubación, se tomó una asada del caldo TSB y se sembró por la técnica de estría por agotamiento en agar TSA por 24 horas a 25 °C.

Para determinar el tiempo en el cual la Cepa 1 alcanzó la fase logarítmica de su crecimiento, se utilizaron dos métodos:

- El método turbidimétrico, registrando lecturas a cada intervalo de tiempo en el espectrofotómetro.
- El conteo directo de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)

3.2.5.1. Método Turbidimétrico

Para realizar esta prueba, se inoculó por asada la cepa en estudio en un tubo de ensayo conteniendo 5 mL de caldo TSB suplementado con NaCl 1% y se incubó a 25 °C durante toda la noche. En un matraz de 250 ml de capacidad, se adicionó 50 ml de caldo TSB, se verificó en el espectrofotómetro la turbidez del medio TSB contenido en el matraz y esa lectura fue considerada como la lectura blanco. A continuación, se transfirió asépticamente 1 ml del cultivo de toda la noche de la Cepa 1 al matraz conteniendo 50 ml del medio de TSB y se registró inmediatamente la turbidez, esta fue considerada como lectura en el tiempo 0, posteriormente se realizaron lecturas cada hora en el espectrofotómetro (VARIAN Cary 50BIO UV visible) hasta llegar a la fase estacionaria.

3.2.5.2. Recuento en placa

Para estimar el número de UFC/ml se realizó el recuento en placa a las 6 horas (fase logarítmica).

A las 6 horas de iniciada la cinética de crecimiento, se tomó 1 ml del matraz de 250 ml que contenía 50 mL del caldo de TSB en el que se había inoculado la Cepa 1 proveniente de un cultivo de toda la noche. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en tubos conteniendo 9 ml de solución salina, desde 10^{-1} hasta 10^{-11} ; luego se tomó 0.1 ml de cada dilución y por diseminación utilizando una espátula de Digalskry, se inocularon por triplicado en placas Petri conteniendo agar TSA las que fueron incubadas a 25 °C por 24 horas. Luego de la incubación se realizó el conteo de UFC/ ml.

3.2.6. Aislamiento de bacteriófagos

El aislamiento de los bacteriófagos se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Phumkhachorn (2010) con modificaciones.

Para ello las muestras de agua de mar colectadas fueron centrifugadas a, $3300 \times g$ (Centrífuga 5702 R marca Eppendorf) durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes filtrados utilizando un equipo de filtración con membrana de 0.22 μm de porosidad (Merck Millipore®, Alemania).

Se tomó 50 ml del sobrenadante de la muestra y fue enriquecido con 50 ml de doble concentración de caldo de TSB, al que se le adicionó 1% de NaCl y 200 μ l de CaCl_2 a 20 mM, conteniendo 1 ml células de un cultivo de fase logarítmica de la Cepa 1 aislada. Después de 24 horas de cultivo aeróbico, a 25°C, los restos bacterianos fueron removidos por centrifugación a 3300 x *g* por 15 minutos y los sobrenadantes fueron filtrados nuevamente, a través de membranas de jeringa estériles de 0,22 μ m de porosidad (PES Syringe Filter MS ®.) Los filtrados estériles obtenidos se conservaron en refrigeración a 4°C.

3.2.7. Prueba del “*spot test*” para determinar la presencia de los bacteriófagos

Se determinó la actividad lítica del bacteriófago mediante la prueba de la gota o spot test (Bigby & Kropinski, 1989), prueba que permite de forma rápida, comprobar si una cepa bacteriana es sensible o no a determinados fagos, colocando una pequeña gota o "mancha" del fago sobre una placa inoculada con la bacteria. Es un ensayo cualitativo, no cuantitativo.

Para esta prueba se añadió 200 μ l de un cultivo en fase logarítmica de la Cepa 1 en un tubo de prueba conteniendo 3ml de agar semisólido al 0,7 % de agar TSA conteniendo 1% NaCl y a 45°C de temperatura, el cual se vertió sobre una placa Petri conteniendo agar TSA fundido y suplementado con NaCl 1% y 20 μ l de Cl_2Ca a 20mM de concentración final. Una vez solidificada la doble capa, se depositó con ayuda de una micropipeta, 50 μ l de la suspensión de fagos en la placa. Se dejó secar la placa en la cabina de bioseguridad y se incubó a 25°C por 24 horas. La aparición de zonas de aclaramiento evidenció la presencia de bacteriófagos. Para el control, se utilizó la misma metodología y el goteo se realizó con solución salina.

3.2.8. Purificación de las placas de lisis

Corroborada la presencia del fago se procedió a realizar la purificación de las placas de lisis (UFP/ml), para lo cual se realizó la técnica de la doble capa (Paterson, 1969). Una vez aparecidas las placas de lisis en las placas Petri

conteniendo Agar TSA, éstas fueron cuantificadas para hallar las Unidades Formadoras de Placas (UFP/ml) y luego marcadas y codificadas.

Con ayuda de un asa de siembra en aro en ángulo recto con respecto al alambre de nicrom, se colocó el aro sobre la placa de lisis y se presionó para cortar el agar alrededor, de tal forma que el “taco” de agar conteniendo la placa de lisis quedó atrapado en el aro. Este “taco” de agar se trasladó y se depositó en un vial tipo Eppendorf conteniendo 1 ml de PBS estéril (0.1 M). Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se agregó 2 - 3 gotas de cloroformo y se agitó en *vortex* por 1 minuto para matar las bacterias.

Los viales tipo Eppendorf conteniendo las placas de lisis fueron centrifugados a 3300 *g* por 5 minutos para eliminar los restos bacterianos. Los sobrenadantes obtenidos (conteniendo los fagos) fueron filtrados nuevamente con un filtro de jeringa de 0,22 μm de diámetro y colectado en un vial tipo Eppendorf estéril y conservado en refrigeración. Este procedimiento se repitió tres veces para corroborar la pureza de las placas de lisis aisladas.

3.2.9. Amplificación del bacteriófago “stock de trabajo”.

En un matraz conteniendo 500 ml de caldo TSB suplementado con NaCl 1%, se agregó 5 ml de un cultivo en fase logarítmica de la Cepa 1 y 5 ml del lisado fágico y se incubó a 25°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la remoción de los restos bacterianos mediante centrifugación, a 3300 *g* por 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,22 μm de porosidad. Los filtrados obtenidos (stock de trabajo) se mantuvieron a 4°C.

3.2.10. Cuantificación del stock trabajo de bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa.

La titulación de los bacteriófagos se realizó mediante la técnica de la doble capa según Paterson, 1969. Se realizaron diluciones seriadas al décimo desde 10^{-1} hasta 10^{-10} del stock de fagos filtrado (stock de trabajo) en tubos

conteniendo 9 ml de buffer PBS (0.1M).estéril. Luego, a 10 tubos vacíos se agregó en cada tubo, 1 ml del cultivo de toda la noche de la Cepa 1 y 1 ml de cada dilución del bacteriófago. Se esperó un tiempo de 3 minutos para asegurar que los bacteriófagos infecten a una gran cantidad de bacterias; transcurrido ese tiempo a cada tubo conteniendo la mezcla bacteria-bacteriófago, se le agregó 3 ml de agar semisólido TSA al 0,7 % suplementado con NaCl 1% y 20 μ l de Cl_2Ca 20mM a 45°C de temperatura, el cual fue vertido sobre placas Petri conteniendo agar TSA. Una vez solidificado el agar, las placas fueron incubadas a 25°C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó titulación mediante la siguiente formula:

$$\text{UFP/ mL} = (\text{Número de placa} * \text{Factor de dilución}) / \text{Volumen de la alícuota.}$$

3.2.11. Caracterización por microscopía electrónica del bacteriófago aislado.

La morfología del bacteriófago aislado fue determinada mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Para ello las muestras con los fagos fueron enviadas a la Universidad de Hiroshima en Japón. La técnica empleada corresponde a la utilizada en el Laboratorio de Patobiología Acuática de dicha universidad, la que se realizó por tinción negativa con acetato de uranilo al 2% en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM-1200EX a 80 kV.

3.2.12. Caracterización Biológica del bacteriófago aislado

3.2.12.1. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago

La prueba de la estabilidad térmica se realizó de acuerdo a la metodología seguida por Haq (2012) con modificaciones. Un mililitro del buffer PBS estéril (0.1M) conteniendo bacteriófagos con un título de 8×10^8 UFP mL^{-1} , fueron dispensados en tubos de ensayo de 16 x 150 mm y sometidos a temperaturas de 20, 30, 40, 50 y 60°C en baño maría (MRC, BH-200), por 1

hora. Concluido el tiempo, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

3.2.12.2. Efecto de la exposición a la luz UV

La evaluación de la sensibilidad de los bacteriófagos a la luz UV fue realizado de acuerdo a la metodología utilizada por Wong (1994). Un mililitro del buffer PBS (0,1M) estéril conteniendo bacteriófagos con un título: 9×10^6 UFP.mL⁻¹, fueron dispensados en tubos de ensayo de 16 x 150 mm, los cuales fueron expuestos a luz UV (onda corta). La lámpara de luz UV estuvo a 20 cm de altura sobre las placas Petri por 10, 30, 60 y 90 segundos. Finalizado el tiempo de exposición, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

3.2.12.3. Sensibilidad del fago al cloroformo

La evaluación de la sensibilidad de los bacteriófagos al cloroformo fue realizado de acuerdo a la metodología utilizada por Wong (1994). Medio mililitro de bacteriófagos en solución PBS (0.1M) estéril con un título: 6×10^7 UFP.mL⁻¹ fueron dispensados en tubos de ensayo a los cuales se les adicionó 0.1 mL de cloroformo (grado: PA) e inmediatamente se mezclaron por 10 minutos a temperatura ambiente utilizando un *vortex*.

Una vez concluido el tiempo, los tubos de ensayo fueron sometidos a centrifugación, a 3300 x g por 10 minutos. El sobrenadante fue utilizado para determinar el título final de los bacteriófagos. El mismo procedimiento fue llevado a cabo con el grupo control al cual se sustituyó el cloroformo por solución salina estéril al 0.85%. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

3.2.12.4. Resistencia del fago al pH

La evaluación de la sensibilidad de los bacteriófagos a diferentes pH fue realizado de acuerdo a la metodología utilizada por Haq (2012). Quinientos microlitros de bacteriófagos en solución buffer PBS con un título de 7×10^6

UFP.mL⁻¹, fueron dispensados en tubos de ensayo los cuales contenían 5 mL de buffer PBS ajustado en intervalos de 1 unidad de pH, desde 2 hasta 8, utilizando HCl o NaOH a 25°C durante una hora. Culminado el tiempo, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

3.2.12.5. Determinación del rango de hospederos

Se utilizó la técnica modificada del *spot test* o “gota” según Phumkhachorn (2010). Cincuenta microlitros de un cultivo overnight de cada cepa indicadora, se dispensó en tubos conteniendo 3 mL de agar semisólido TSA (0.7 %) a 45 °C. Esta mezcla se vertió sobre placas Petri conteniendo agar TSA con la finalidad de formar un césped bacteriano. Una vez solidificada la doble capa, se depositaron gotas de 50 µl del bacteriófago para cada una de las cepas indicadoras. El césped de las cepas sensibles debería mostrar una zona de lisis en el lugar donde se depositaron las gotas.

Las 24 cepas indicadoras ensayadas fueron: *Vibrio fluvialis*, *Listonella anguillarum* (NCIMB 6), *Vibrio splendidus* (NCIMB 1), *Photobacterium damsela subsp. damsela* (NCIMB 2184), *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (NCIMB 2058), *Vibrio harveyi* (NCIMB 1280), *Flexibacter maritimus* (NCIMB 2153), *Aeromonas hydrophila* (ATCC®7966TM), *Aeromonas hydrophila* (ATCC®49140TM), *Aeromonas hydrophila* (ATCC®35654TM), *Aeromonas salmonicida* (ATCC®33658TM), *Streptococcus iniae* (ATCC ® 29178TM), *Enterobacter cloacae subsp. cloacae* (ATCC® 13047™), *Alcaligenes faecalis subsp. faecalis* (ATCC® 35655™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 14506™), *Edwardsiella tarda* (ATCC® 15947™), *Citrobacter braakii* (ATCC® 10625™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Vibrio alginolyticus* (ATCC® 17749™), *Yersinia ruckeri* (ATCC® 29473™), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC® 13525™), *Pseudomonas putida* (ATCC® 31483™) y *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC® 17802™). (Tabla 4)

3.2.12.6. Curva de un paso

Siguiendo la metodología descrita Phumkhachorn (2010) con modificaciones, el período de latencia y el tamaño de la explosión fueron determinados a partir de la curva de un paso.

Diez mililitros de un cultivo en fase logarítmica de la Cepa 1 fueron centrifugados a $3300 \times g$ por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 10 ml de caldo TSB suplementado con 1% NaCl. A esta suspensión se le adicionó 5 ml de bacteriófagos en PBS (7×10^8 UFP/mL) a una MOI de 0.1 y se incubó a 25°C por 30 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, la mezcla fue centrifugada a $3300 \times g$ por 20 minutos y el *pellet* fue resuspendido en 50 ml de caldo TSB suplementado con NaCl 1%.

Se tomaron muestras cada 10 minutos en un periodo de 3 horas, las que fueron tituladas por el método de la doble capa. La prueba se realizó por triplicado.

3.2.12.7. Reducción del crecimiento bacteriano

El test de cinética de infección del bacteriófago fue realizado de acuerdo a la metodología utilizada por Haq (2012). Un mililitro de un cultivo de la Cepa 1 fue *inoculado* en dos matraces conteniendo 50 mL de caldo TSB suplementado con NaCl 1%. A uno de ellos se le adicionó 1 ml del bacteriófago en solución buffer PBS (0.1M) con un título de: 8×10^8 UFP.mL⁻¹; el otro matraz no se le inoculó bacteriófagos, por lo que se utilizó como control. Posteriormente, ambos matraces, se incubaron a 25°C en agitación continua. La densidad óptica (DO₆₀₀) fue medida en intervalos de 1 hora por 9 horas en un espectrofotómetro (VARIAN Cary 50BIO UV visible). La prueba se realizó por triplicado.

3.2.12.8. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando pruebas de normalidad y de igualdad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett respectivamente. Si los supuestos de normalidad y homocedasticidad no

fueron cumplidos, se utilizó pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunnet para evidenciar diferencias significativas entre grupos. Para el caso de la prueba del cloroformo se aplicó la prueba de *t- student* para dos muestras con varianzas iguales. Todas las pruebas se analizaron con un nivel de significancia de 0.05. El programa utilizado fue Minitab® 16 para Windows.

4. CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Identificación fenotípica de la Cepa 1 mediante el kit API® 20E (Biomeriux)

La Cepa 1 identificada mediante el kit API 20E (Tabla 3) correspondió al complejo *Aeromonas hydrophila* / *caviae*/sobria 1/*V. fluvialis* con el Perfil 3006526 (Figura 5 y Tabla 3).



Figura 5. Perfil bioquímico 3006526 de la Cepa 1 según Apiweb®

Tabla 3. Perfil bioquímico de la Cepa 1 según Apiweb®

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra					
<i>Vibrio fluvialis</i>	55.1	0.58	IND	80%	SOR	1%		
<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria 1</i>	44.6	0.55	IND	85%	SOR	3%	AMY	75%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra					
<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria 2</i>	0.1	0.13	LDC	80%	CIT	80%	IND	85%
			SOR	9%	AMY	75%	ARA	5%
Pruebas complementarias(s)	GLUCOSA _g	ESC (HYD.)	O/129 R	RM/MR				
<i>Aeromonas caviae</i>	-	+	+	+				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	+	86%				
<i>Vibrio fluvialis</i>	0%	NT	-	NT				
<i>Aeromonas sobria</i>	+	-	+	-				

4.1.2. Identificación molecular de la Cepa 1

La bacteria huésped fue identificada como *Vibrio fluvialis*. Las secuencias obtenidas fueron registradas en la base de datos GenBank – NCBI con los códigos de acceso

Gen 16S: KY952877

Gen rpoA: KY952878

4.1.3. Curva de crecimiento bacteriano

Se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro tomando como referencia las lecturas en el espectrofotómetro, el tiempo considerado para determinar las UFC/ml fue a las 6 horas ($10,8 \times 10^9$ UFC/ml), esta concentración se utilizó en lo sucesivo del experimento (Figura 6).

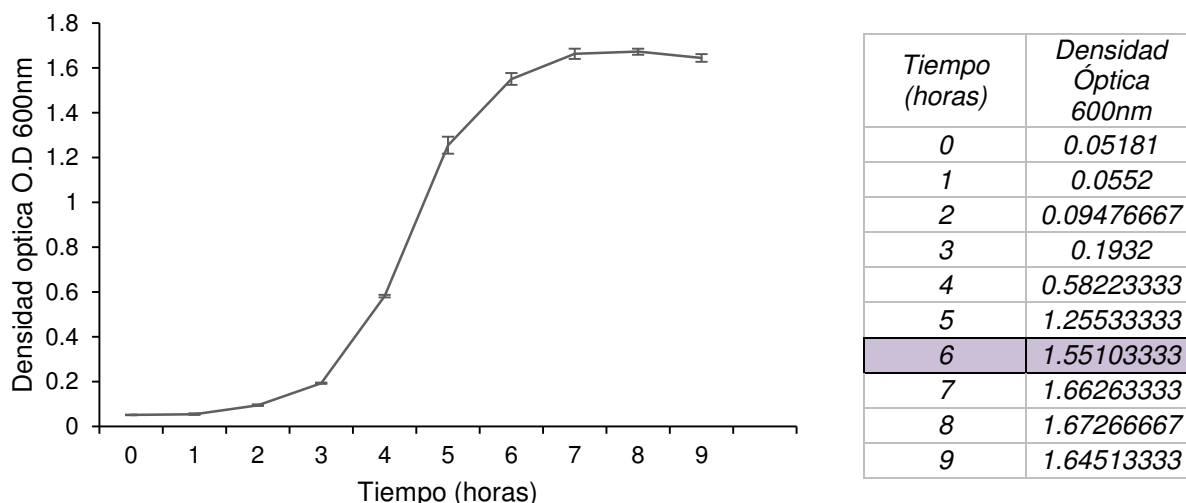


Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa *V. fluvialis* (Cepa1)

4.1.4. Aislamiento y purificación del bacteriófago Vf1

Mediante la prueba de la gota o *spot test*, se determinó la presencia y elevada actividad lítica del bacteriófago a *Vibrio fluvialis* su cepa huésped, donde se evidenció zonas de aclaramiento en placas conteniendo un césped bacteriano de la bacteria hospedera. (Figura 7). El bacteriófago aislado fue designado como Vf1. Las placas de lisis obtenidas fueron claras y pequeñas, forma circular, con bordes definidos y de 0.5 a 1 mm de diámetro aproximadamente (Figura 8).

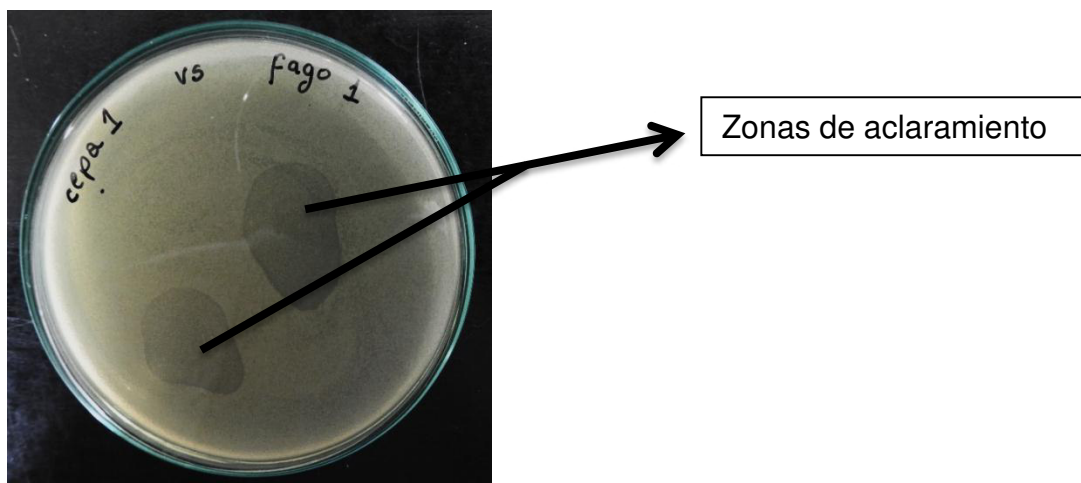


Figura 7. Capacidad lítica del bacteriófago Vf1 sobre *V. fluvialis* según prueba de la gota

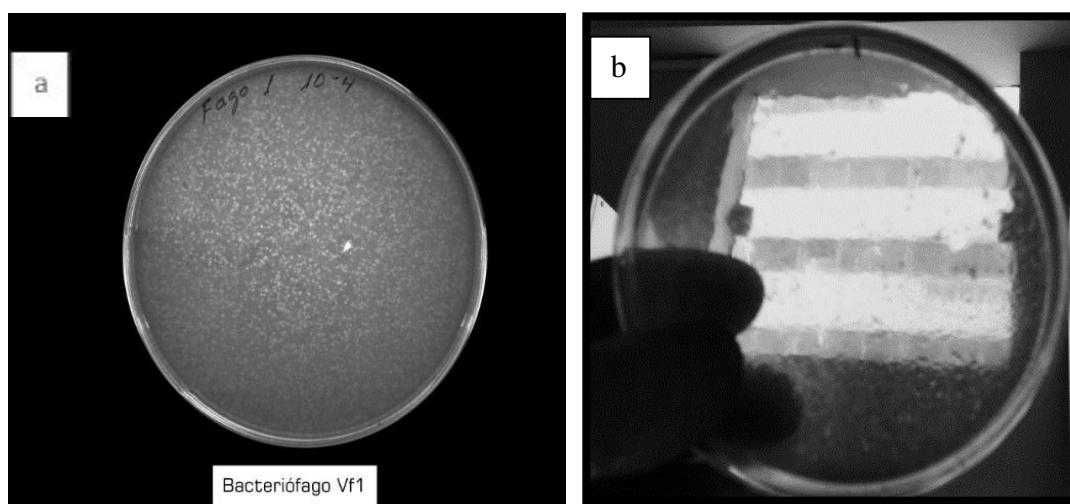


Figura 8. a) Capacidad lítica del bacteriófago Vf1 sobre *V. fluvialis* según método de la doble capa. b) Placa de Petri totalmente transparente como consecuencia de la capacidad lítica del bacteriófago Vf1 sobre *V. fluvialis*.

4.1.5. Producción masiva y cuantificación del bacteriófago

En la etapa de producción masiva del bacteriófago se obtuvo 500 ml de un stock de fagos con un título de 8×10^8 UFP/ml.

4.1.6. Caracterización del bacteriófagos Vf1 por microscopía electrónica de transmisión

Las microfotografías electrónicas revelaron que el fago Vf1 pertenece a la familia Siphoviridae por presentar cabeza de forma icosaedrica con un diámetro de 82.773 nm y un talo largo no contráctil cuya longitud es de 142.318 nm. (Figura 9).

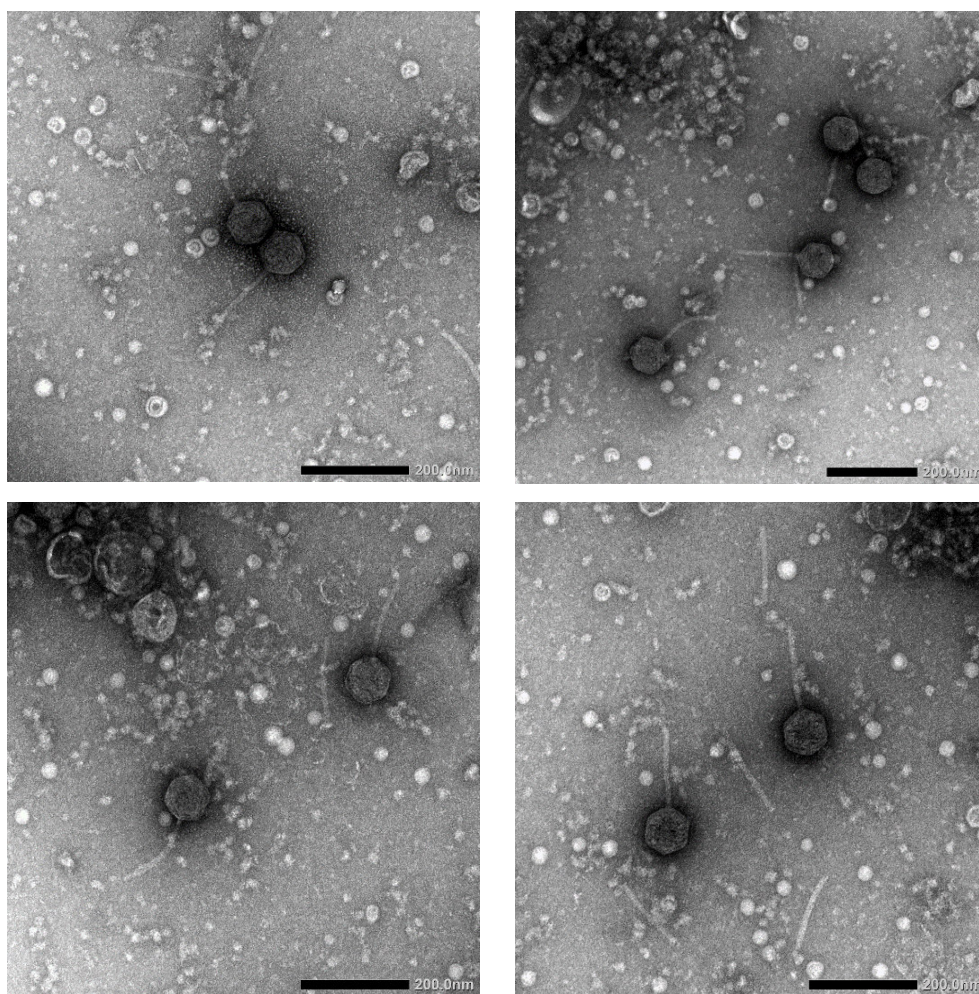


Figura 9. Micrografías electrónicas del bacteriófago Vf1 que infecta a V. fluvialis

4.1.7. Caracterización biológica del bacteriófago Vf1

4.1.7.1. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del bacteriófago

Para analizar la resistencia al calor del bacteriófago Vf1, se realizó la prueba de la estabilidad térmica por 60 minutos. Como se muestra en la figura 10, el fago mantiene su viabilidad a 20°C, viabilidad que disminuyó conforme se incrementó la temperatura declinando su viabilidad a 40°C y siendo nula a partir de 50 °C.

Se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis indicando diferencias significativas en los resultados ($p=0.017<0.05$).

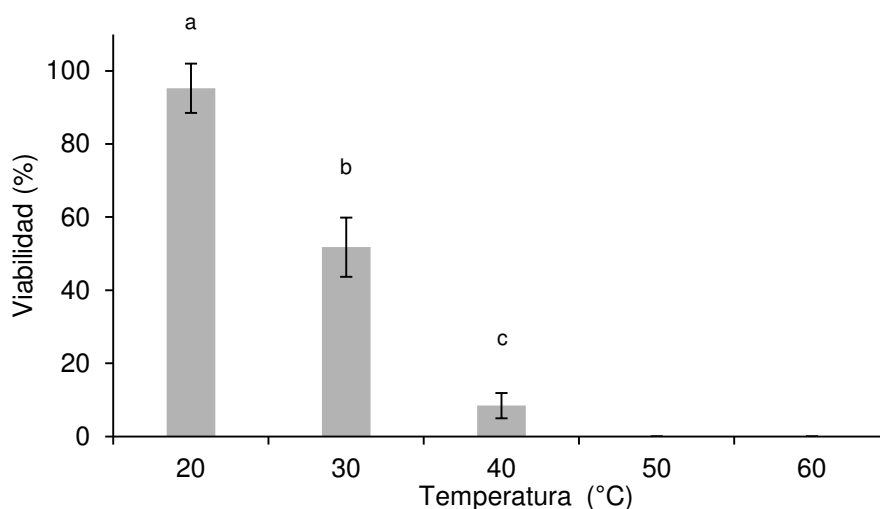


Figura 10. Estabilidad térmica del bacteriófago Vf1.

4.1.7.2. Efecto a la luz UV

Se determinó el efecto de la exposición a la luz UV sobre la viabilidad del bacteriófago Vf1, observando que el bacteriófago Vf1 es sensible a la luz UV. La exposición del fago durante 60 segundos tuvo una disminución en su viabilidad del 99.67%; mientras que a los 90 segundos se redujo un 100% en comparación con el control que no fue sometido a luz UV (Figura 11).

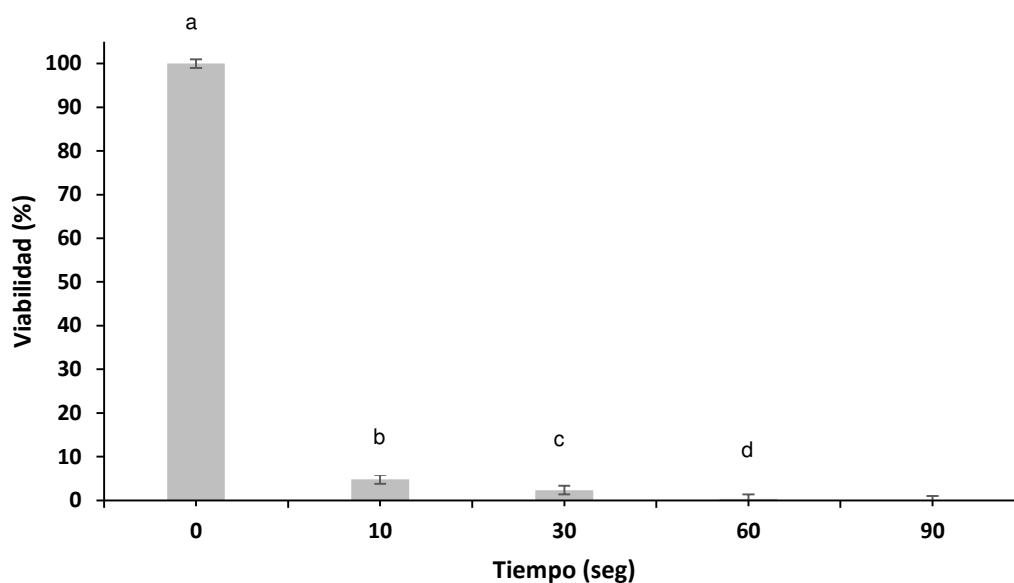


Figura 11. Efecto de la luz UV sobre la viabilidad del fago Vf1

4.1.7.3. Sensibilidad al cloroformo

El cloroformo es un solvente orgánico utilizado en la conservación de los lisados fágicos por su acción antimicrobiana, aunque existen bacteriófagos sensibles a este reactivo. Los resultados evidenciaron que el bacteriófago Vf1, no es significativamente ($p>0.05$) resistente al cloroformo ya que su viabilidad se redujo al 50% (3×10^7 UFP/ml) después de la exposición a este agente en comparación del control (6×10^7 UFP/ml) que solo fue expuesto a solución salina. (Figura 12).

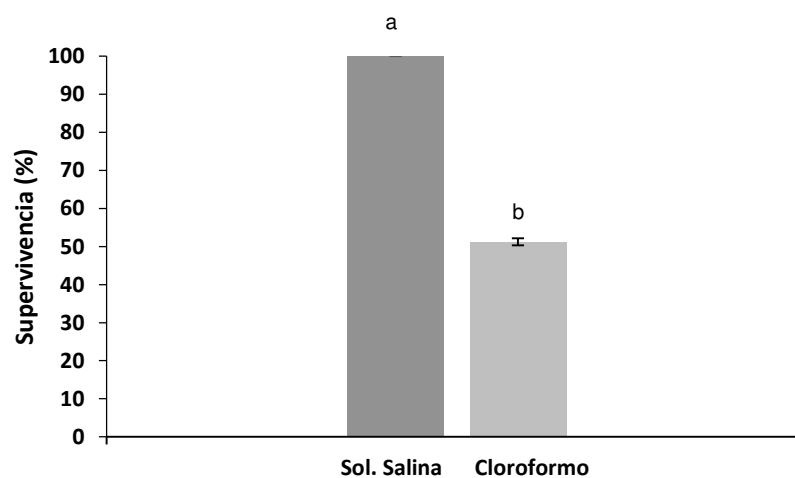


Figura 12. Sensibilidad del fago Vf1 al cloroformo.

4.1.7.4. Resistencia del fago Vf1 al pH

Se determinó el pH óptimo del bacteriófago Vf1 ensayando su viabilidad frente a diferentes unidades de pH. (Figura 13).

El bacteriófago Vf1 mantiene significativamente ($p>0.05$) una elevada viabilidad a valores de pH comprendidos entre 7 y 8, disminuyendo a valores de pH comprendidos entre 5 y 6, siendo prácticamente nula a 2,3 y 4. Se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis indicando que no hay diferencias significativas entre el pH 7 y 8 dado que la z score fue de 2.31 y 2.21 respectivamente.

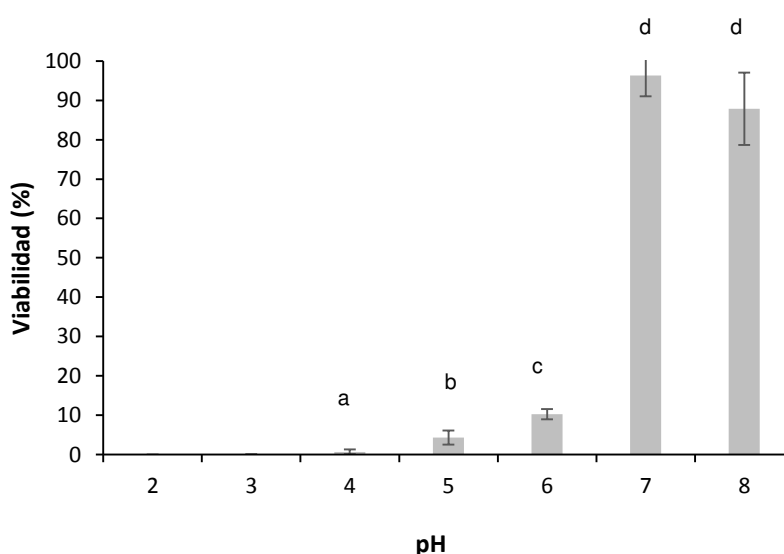


Figura 13. Resistencia del fago Vf1 al pH.

4.1.7.5. Determinación del rango de hospederos

Para precisar la especificidad y espectro de hospederos del bacteriófago Vf1, se infectaron 23 cepas bacterianas (Tabla 4). De las 23 probadas, sólo *V. harveyi* NCIMB 1280, resultó ligeramente sensible. Las 22 cepas restantes fueron resistentes.

Tabla 4. Patrón de sensibilidad al bacteriófago Vf1 frente a diversas cepas.

Especie	Cepa	Fago Vf1
<i>V. fluvialis</i>	1	+
<i>Listonella anguillarum</i>	NCIMB 6	-
<i>Vibrio splendidus</i>	NCIMB 1	-
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	NCIMB 2184	-
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	NCIMB 2058	-
<i>V. harveyi</i>	NCIMB 1280	+/-
<i>Flavobacterium maritimus</i>	NCIMB 2153	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC®7966™	-
<i>A. hydrophila</i>	ATCC®49140™	-
<i>A. hydrophila</i>	ATCC®35654™	-
<i>A. salmonicida</i>	ATCC®33658™	-
<i>Streptococcus iniae</i>	ATCC® 29178™	-
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	ATCC® 13047™	-
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	ATCC® 35655™	-
<i>E. faecalis</i>	ATCC® 14506™	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC® 15947™	-
<i>Citrobacter braakii</i>	ATCC® 10625™	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922™	-
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC® 33787™	-
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC® 17749™	-
<i>Yersinia ruckeri</i>	ATCC® 29473™	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC® 13525™	-
<i>P. putida</i>	ATCC® 31483™	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC® 17802™	-

4.1.7.6. Curva de un paso

A partir de la curva de un paso se determinaron los parámetros de multiplicación del ciclo lítico del bacteriófago Vf1 (Figura 14). Se determinó que el período de latencia dura aproximadamente 20 minutos y el tamaño de la explosión “burst size” fue de 602.86 partículas virales por centro infectivo.

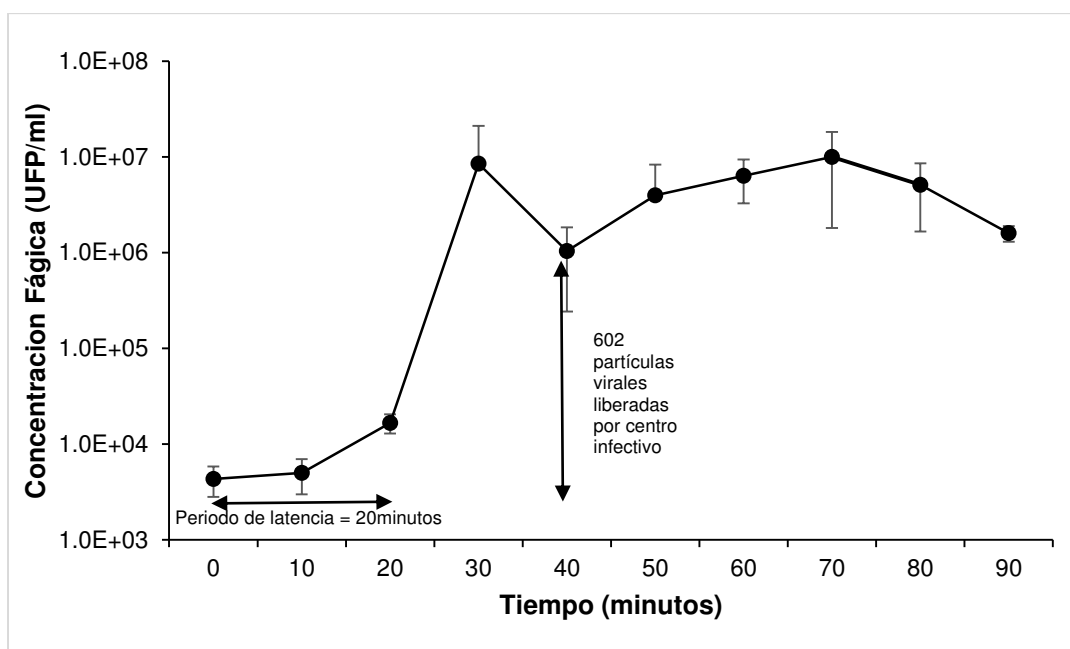


Figura 14. Curva de un paso del bacteriófago Vf1.

4.1.7.7. Reducción de la población bacteriana

La infección de *V. fluvialis* con el bacteriófago Vf1 (título 8×10^8 UFP/ml) fue monitoreada por 9 horas. Se evidenció que el bacteriófago Vf1 es capaz de lisar a su bacteria huésped *V. fluvialis* impidiendo su crecimiento normal (Figura 15).

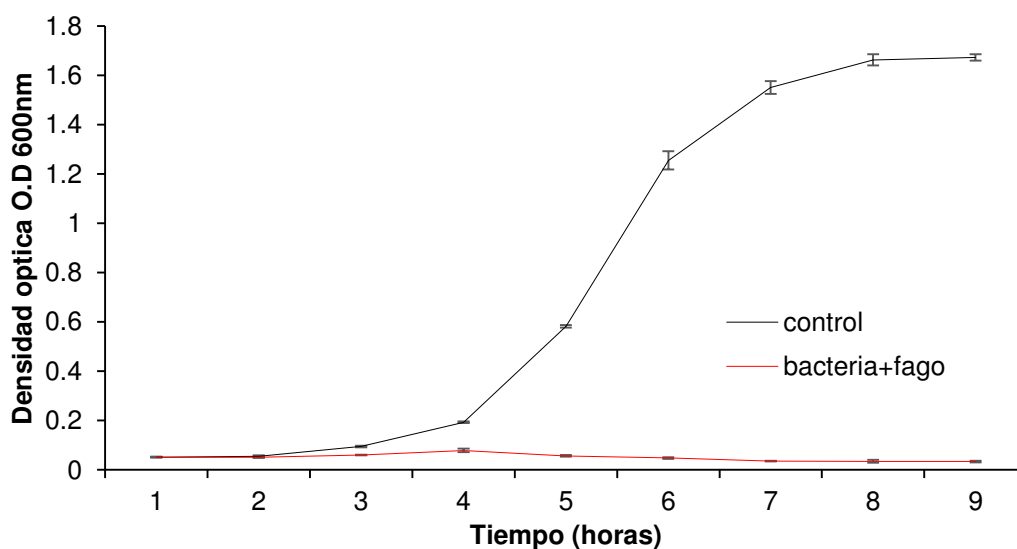


Figura 15. Efecto del fago Vf1 sobre la cepa de *V. fluvialis* en fase logarítmica.

4.2. Discusión

Vibrio fluvialis es un patógeno oportunista emergente transmitido por los alimentos y que ha sido implicado en brotes y casos esporádicos de diarrea aguda. (Huq *et al.*, 1980), así como en infecciones extraintestinales. Por otro lado, esta bacteria también es una amenaza económica significativa para la acuicultura por ser patógena para langostas (Tall, *et al.*, 2003) y peces de cultivo (Li, *et al.*, 2006).

En esta investigación se aisló un bacteriófago lítico contra *V. fluvialis* procedente de agua de mar. En las observaciones al microscopio electrónico de transmisión mostró poseer cabeza icosaédrica de 82.773 nm y un talo largo no contráctil de 142.318 nm de longitud. Según la nomenclatura de la ICTV, actualmente en uso, el mismo pertenece a la familia Siphoviridae y de acuerdo a la clasificación de Bradley (Bradley, 1967) clasifica al morfotipo B, además de que por su morfología se infiere que es de genoma ADN de doble cadena no segmentado.

La microscopía electrónica reveló que dentro de la familia *Siphoviridae*, el fago Vf1 concuerda morfológicamente con bacteriófagos aislados de otras bacterias del género *Vibrio*, como los fagos PW2, (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2010) y fagos ϕ Vh1, ϕ Vh2 y ϕ Vh4 que infectan a *Vibrio harveyi*, éstos últimos aislados de granjas comerciales de cultivo de langostino (Thiyagarajan, *et al.*, 2011). Los fagos pVp-1 que infectan a *Vibrio parahaemolyticus* (Jun *et al.*, 2014) ; Φ H8 y Φ H20 que infectan a *Vibrio anguillarum*, un patógeno importante y responsable de los casos de vibriosis en invertebrados y peces en cultivo (Tan, *et al.*, 2014); VC1, VC2, VC3, y VC5, que infectan a *Vibrio cholerae*, (Benvajirapatch & Renpipat, 2014); y los bacteriófagos P4A y P4F que fueron aislados a partir de biofilms de *Vibrio* sp de un centro de cultivo de abalones (Luo, *et al.*, 2016);

La purificación del fago Vf1 se realizó por el método de la doble capa en agar, método que permitió la obtención de placas de lisis claras de 0,5 a 1 mm de diámetro. Estos diámetros son similares a los reportados para otros vibriófagos como el fago pVp-1 que infecta a *V. parahaemolyticus* quien presentó placas de 1mm de diámetro (Jun, *et al.*, 2014).

La producción masiva de un stock de fagos en caldo TSB con NaCl 1% al que se le adicionó CaCl_2 20 mM., rindió un lisado fágico con un título de 8×10^8 UFP/ml, adecuado para el desarrollo de esta investigación.

En relación a la estabilidad térmica del fago Vf1, mantuvo su viabilidad a 20°C por 60 minutos disminuyendo conforme aumentaba la temperatura; a diferencia de lo reportado por Ning (1996), para el bacteriófago NP-13 específico para *V. fluvialis* el que fue viable en un 95% a 50°C por 30 minutos disminuyendo en un 45% por 30 minutos a 60°C; de la misma manera, el bacteriófago VP9-a (Yan, 2009,) específico para *Vibrio fluvialis*, al igual que el bacteriófago Vf1 a 60° y 65 °C su viabilidad fue nula, respectivamente. Existen reportes que indican que a pesar que los tres bacteriófagos provienen de agua de mar e infectan a la misma bacteria, su capacidad térmica es diferente y que esto depende de las cepas de los bacteriófagos (Yu, *et al*, 2006).

Vf1 al igual que otros vibriófagos como pVp-1 (Jun *et al.*, 2014), SSPOO2, específico para *Vibrio vulnificus* (Lee *et al.*, (2014), perdieron su viabilidad térmica a los 60°C; mientras que a diferencia del fago Vf1, los fagos VC1, VC2, VC3, VC4 y VC5, mostraron estabilidad térmica entre 30 y 60°C (Benvajirapatch & Renpipat, 2014) y los vibriófagos P3K, P4A, P7A, P8D y P9C específico a *Vibrio owensii* mantuvieron su viabilidad al 100% a 37°C, un 80% a 50°C y nula a 70°C (Yu *et al.*, 2013); de igual forma para el fago Φ A318 específico para *Vibrio alginolyticus*, mantuvo su viabilidad a temperaturas menores de 50°C por 60 minutos (Lin *et al.*, 2012).

Esta diferencia de resistencia al calor observada entre los vibriófagos, son características que podrían ser útiles para su aplicación en diferentes ambientes (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2010).

Al probar la sensibilidad al cloroformo sobre la viabilidad del fago Vf1 y comparándolo con la solución salina 0,85% usado como control, se observó que cloroformo sí lo inactiva en un 50%, por lo que no es recomendable su uso como bactericida. Este efecto reductor fue reportado por Hidaka y Tokushige (1978), para el bacteriófago Vp33P que infecta a *Vibrio parahaemolyticus*, y en el que el cloroformo redujo en un décimo su título

($2,0 \times 10^6$ UFP/ml), después de una exposición por una hora. Este efecto reductor en la viabilidad de los fagos, también se presentó en el fago pVp-1 que infecta también a *Vibrio parahaemolyticus*, el que después de una hora de incubación, su viabilidad decreció en un 37,7% (Jun, 2014).

El bacteriófago Vf1 mantuvo su viabilidad en un rango de pH comprendido entre 7 y 8, perdiendo su viabilidad en unidades de pH ácido. Resultados similares se obtuvieron con el fago PW2 que a pH 2 y 3 no pudo ser detectado (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2010) a diferencia de otros vibriófagos que fueron estables en un rango de pH de 6 a 10 (Thiyagarajan, *et al.*, 2011); y de 2 a 11 (Yu, *et al.*, 2013; sin mayor reducción en su viabilidad. Jun (2014), reportó que el fago pVp-1 que infecta a *Vibrio parahaemolyticus*, presenta un rango de estabilidad de 3-11 indicando claramente que podría ser altamente estable en el cuerpo humano. El rango entre 7 y 8 unidades de pH del fago Vf1, indicaría que el fago tendría que ser aplicado por vías que mantengan el pH estable entre 7 y 8 unidades, además que el rango óptimo de pH de este fago se ajusta a los parámetros de aguas continentales y marinas cuyos valores oscilan entre 6,5 – 9, por lo que podría ser factible su aplicabilidad en cultivo de organismos acuáticos.

El fago Vf1 demostró que posee un rango de hospedero muy estrecho ya que sólo fue sensible a su bacteria huésped, al igual que otros vibriófagos (Oakey y Owens, 2000; Lee, *et al.*, 2014); y resistente a la mayoría de las cepas no huéspedes; sólo a *Vibrio harveyi* NCIMB 1280, resultó ligeramente sensible (+/-), no evidenciándose una lisis total, ya que si la lisis hubiera sido total, podría considerarse que ambas bacterias reconocen estructuras idénticas o similares como receptores en su bacteria huésped (Kalatzis, 2016). El hecho que muchos fagos tienen un rango de hospederos estrecho, resulta útil para desarrollar métodos de fago tipificación bacteriana, como lo reportado para *V. fluvialis* por Suthienkul (1993), quien aisló 6 bacteriófagos estables para el rastreo de las fuentes y vías de infección en los brotes originados por esta bacteria en el hombre. Los bacteriófagos que poseen un rango de huéspedes estrecho como Vf1, podrían tener una desventaja para su aplicación en la fagoterapia, ya que un solo fago podría no ser efectivo

contra todos los aislamientos (Vinod, *et al*, 2006); así mismo, cuando se usa un solo fago para controlar a su bacteria huésped, podría ocurrir la aparición de resistencia al fago por parte de la bacteria (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2010), es por ello, que el fago Vf1 podría ser empleado en un *cocktail* de fagos. Cabe señalar, que el fago Vf1 requiere ser enfrentado contra otros aislamientos de *Vibrio fluvialis*, para poder determinar su rango real de hospederos para su aplicación en fagoterapia.

En experimentos realizados en laboratorio (datos no publicados) utilizando como modelo biológico a *Artemia* sp. se probó la eficacia del fago Vf1 como tratamiento profiláctico contra infecciones inducidas causadas por *Vibrio fluvialis* utilizando nauplios de *Artemia* sp como modelo biológico, y de esta manera reducir la tasa de mortalidad originada por la infección experimental. Se pudo evidenciar una tasa de supervivencia del 90% en comparación al control en el que solo se obtuvo un 52%; además, el empleo del fago al inicio de la infección, demostró mayor supervivencia de estos microcrustáceos tratados con bacteriófagos. Estos resultados experimentales están en concordancia con la evaluación de la infección por acción del fago Vf1, el cual redujo drásticamente el crecimiento de *Vibrio fluvialis* en caldos de cultivo, comparado con el control, por lo que lisa de forma eficiente a su bacteria huésped en crecimiento. En conclusión, el tratamiento con fagos demostró ser eficaz para el control de mortalidades causadas por la bacteria oportunista utilizando como modelo biológico a *Artemia* sp.

Para conocer el crecimiento poblacional de un fago y evaluar la eficiencia de su infección, se realizan las curvas de “un paso” o curvas *one-step*, con la finalidad de determinar el número de viriones liberados por bacteria infectada, conocido como “*burst size*” y la duración del periodo de latencia. El período de latencia y el “*burst size*” o tamaño de la explosión son parámetros esenciales para entender las variaciones entre fagos y hospederos (Wang, 2006). Siguiendo lo reportado por Middelboe, *et al.*, (2010), la MOI o *multiplicidad de infección* que es el número de fagos (UFP) dividido por el número de bacterias (UFC) debe encontrarse entre 0.1 y 0.01 debido a que una MOI elevada incrementa la posibilidad que más de un fago

infecte a una bacteria, es por ello que la MOI para el fago Vf1, fue de 0,1. La curva de un paso del fago Vf1 tuvo un período de latencia que duró aproximadamente 20 minutos y el tamaño de la explosión “burst size” fue de 602.86 partículas virales por centro infectivo. Luo *et al* (2015) reportó para el vibriófago P4A aislado de agua de mar de un cultivo de abalones, un resultado similar de 630 en el número de partículas virales por centro infectivo en un periodo de latencia mayor (30 minutos) al fago Vf1. Se han reportado para fagos contra *Vibrio harveyi* períodos de latencia de 35 y 40 minutos y un “burst size” de 100 y 170 para los fagos ϕ H17-7b y ϕ H17-8b, respectivamente (Okano, 2007); igualmente para la misma bacteria, 30 y 120 minutos con un burst size de 78 por centro infectivo (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2010). Para *Vibrio alginolyticus*, Lin, (2012), reportó un burst size de 72 UFP por célula infectada para el fago ϕ 318; y de 65 y 100 minutos con un burst size de 23 ± 2 UFP por centro infectivo para *Vibrio vulnificus* (Lee, *et al.*, 2014). De acuerdo a lo reportado por Abedon, *et al.*, 2001 y Middelboe *et al*, 2010), mientras más corto es el período de latencia y mayor el tamaño de la explosión, el bacteriófago tiene mayor posibilidad de ser aplicado en fagoterapia, ya que al producirse más partículas virales a partir de un centro infectivo, aumentan las posibilidades de un mejor control de las poblaciones bacterianas, por lo tanto, el fago Vf1 con un período de latencia corto y un tamaño de explosión elevado, resulta útil para pruebas en fagoterapia.

5. CONCLUSIONES.

1. En esta investigación se aisló y caracterizó el bacteriófago Vf1 procedente de la Bahía del Callao, capaz de infectar a *Vibrio fluvialis*.
2. El bacteriófago Vf1, pertenece a la familia *Siphoviridae* del orden Caudovirales compuesto de una molécula de doble hebra de ADN no segmentado.
3. El bacteriófago Vf1, es eficiente en reducir la población de su bacteria huésped, al poseer una fase de latencia de 20 minutos y un tamaño de explosión de 602.86 partículas virales por centro infectivo.
4. Las pruebas posteriores demostraron la capacidad del bacteriófago para controlar poblaciones bacterianas.

6. RECOMENDACIONES

Se debe evaluar el uso de un reactivo alternativo al cloroformo, pues existen fagos como el Vf1, en la que su viabilidad se ve reducida por este solvente.

Para emplear el bacteriófago Vf1 en fagoterapia, es necesario conocer el tamaño y la secuencia de su genoma, para descartar la presencia de genes de lisogenia así como la transferencia de genes de virulencia a la bacteria huésped.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon, S.T., Herschler, T. y Stopar, D. A. (2001). Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4233-4241.
- Abedon, S.T., Kuhl, S., Blasdel, B., & Kutter, E. (2011). *Bacteriophage* 1:2, 66-85.
- Ackerman, H.W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief Review. *Arch Virol*, 146, 843–857
- Ackerman, H.W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*, 152 (2), 227-43
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., y Troitsky, N. (1998). Bacteriophages Show Promise as Antimicrobial Agents. *Journal of Infection*, 36, 5-15
- Atterbury, R.J., Van Bergen, M., Ortiz, F., Lovell, M.A., Harris, J.A., De Boer, A., Wagenaar, J.A., Allen, V.M., y Barrow, P.A. (2007). Bacteriophage Therapy To Reduce Salmonella Colonization of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14), 4523-4549.
- Augusto, D. (2011). La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Austin, B. (2009). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140, 310–317.
- Azeredo, J. & Sutherland, I. (2008). The use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 261-266.
- Barrow, P., y Soothill, S. (1997). Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*, 270, 5(7).
- Benvajirapatch, D. & Renpipat, S. (2014). Isolation and characterization of bacteriophages specific to *Vibrio cholerae*. Recuperado de: [http://tsb2014.mfu.ac.th/proceeding/03_PDF/\(FF\)%20Food%20biotech%20%20Food%20safety/TSB2014%20Proceeding%20PR-FF-03.pdf](http://tsb2014.mfu.ac.th/proceeding/03_PDF/(FF)%20Food%20biotech%20%20Food%20safety/TSB2014%20Proceeding%20PR-FF-03.pdf)
- Borie, C y Navarro, C. (2007). Virus que matan bacterias: ¿el fin de los antimicrobianos? *TecnoVet*, 13 (2). Recuperado de <http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/15899/16386>
- Bradley, D. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31 (4), 230-314.

Breitbart, M & Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus everywhere the same virus. *Trends in Microbiology*, 13 (6).

Borysowski, J. & Gorski, A. (2008). Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? *International Journal of Infectious Diseases*. 12, 466-471.

Cabello, F. (2003). Antibióticos y Acuicultura. Un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente, la salud humana y animal en Chile. Análisis de Políticas Públicas. Serie APP. Número 17. Recuperado de: <http://studylib.es/doc/7633457/app17-antibioticos-y-acuicultura>

Cabello, Felipe. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8 (7), 1137 – 1144.

Calendar, R. (2006). The Bacteriophages, Oxford University Press, Inc.

Cann, A.J. (2005). Principles of molecular virology. Elsevier Academic Press.

Cartmell, W.S., Avery, L.M., & Stephenson, T. (2005). Bacteriophages – Potential for application in waste water treatment processes. *Science of The Total Environment*, 339, (1-3), 1-18

Chakraborty, R., Chakraborty, S., De, K., Sinha, S., Mukhopadhyay, A., Khanam, J., Ramamurthy, Takeda, Y., Bhattacharya, S., Nair, G. (2005). Cytotoxic and cell vacuolating activity of *V. fluvialis* isolated from paediatric patients with diarrhea. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 707-716.

Chen, P.J., Tseng, C.C., Chan, H.T., Chao, C.M. (2012). Acute Otitis due to *V. fluvialis* after Swimming. Hindawi Publishing Corporation .*Case Reports in Emergency Medicine*, Article ID 838904, 2 p .

Chhibber, S. y Kumari, S. (2012). Application of Therapeutic Phages in Medicine. Recuperado de: <http://www.intechopen.com/books/bacteriophages/therapeutic-bacteriophages>

Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Alves, N., Silva, B. S., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P., Thompson, F. L. (2011). *Vibrio communis* sp. nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 362–368.

Clark, J. & March, J. (2006). Bacteriophages and Biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterial. *Trends in Biotechnology*, 24 (5), 212-218.

Curtin, J. & Donlan, R. (2006). Using Bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 50 (4), 1268.

Díaz, J. (2006). Susceptibilidad de los hospederos bacterianos a la infección de Colifagos provenientes de aguas residuales. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana. México.

Downes, F. P. & Ito, K. (eds) (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*: American Public Health Association
Recuperado de:
<http://ajph.aphapublications.org/doi/book/10.2105/MBEF.0222>

Duckworth, D.H. (1976). Who discovered bacteriophage? *Bacterial Rev*, 40, 793-802.

Duckworth, D.H. & Gulig, P.A. (2002). Bacteriophages Potential Treatment for Bacterial Infections. *Biodrugs*, 16(1), 57-62.

Espejo, T.R. (1973). Bacteriófagos. Serie de Biología .Monografía N° 12. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos. Secretaría General de la OEA.

Farmer, J.J. III & Hickman-Brenner. (2006). The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. *Prokaryotes* 6, 508-563.

Fernández, C. (2016). Eficacia de la fagoterapia contra la infección inducida por *Vibrio alginolyticus* en cultivos de *Artemia franciscana* (Título Profesional: Biólogo - Microbiólogo – Parasitólogo). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú

Fernández, C., Flores, V. & Medina, M. (2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista Peruana de Biología*. 24, 93-100.

Fischetti, VA. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterial. *Current Opinion in Microbiology*, 11 (5), 393 – 400.

Furniss, A., Lee, J., Donovan, T. (1977). Group F, A new *Vibrio*. *The Lancet*, 30 (8037), 565 -566.

García, E. & López, R. (2002) “Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos” *Revista Española de Quimioterapia*, 15(4), 306-312.

García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*, 21(8), 373 -382.

Garrrity, G., Bell, J. & Lilburn, T. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition, New York: Springer- Verlag. doi:10.1007/bergeyssoutline200405.

Goode, D., Allen, V.M. , Barrow, P.A. (2003). Reduction of Experimental *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8), 5032-5036.

Goodridge, L. y Abedon, S.T. (2003). Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry. Recuperado de: <http://www.cienciaviva.eu/rede/oceanos/2desafio/16.pdf>

Golkar, Z., Bagasra, O & Pace, D.G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries* 8 (2):129-136. doi:10.3855/jidc.3573

Goossens, H., Ferech, M., Stichele, R.V., Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*, 365 (12), 578 – 87

Gutiérrez, D. (2010). Evaluación de la técnica RAPD-PCR para el estudio de la diversidad genética de bacteriófagos. Proyecto fin de máster. Universidad de Oviedo. Asturias.

Guttman, B., Raya, R., Kutter, E. (2005). Basic Phage Biology, pp 29-66. En: Kutter, E., Sulakvelidze A. (editors). *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Florida, EE.UU.

Haq, I., Chaudhry, W., Andleeb, S., Qadri, I. (2012). Isolation and Partial Characterization of a Virulent Bacteriophage IHQ1 Specific for *Aeromonas punctata* from Stream Water. *Microb Ecol*. 63, 954–963.

Harper, D.R. & Morales, S. (2012). Bacteriophage therapy: practicability and clinical need meet in the multidrug-resistance era. *Future Microbiol*, 7(7), 797–799.

Herrero, M. (2013). Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de la *Listeria monocytogenes*. (Tesis de Maestría). Universidad de Oviedo. España.

Hidaka, T. & Tokushige, A. (1978). Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages in sea water. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ*, 27 (1), 79-90.

Hodge, T. W. (1995). Diarrhea Associated with *Vibrio fluvialis* Infection in a Patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*. 21,237-8

Huang, KC y Hsu, R. (2005). *Vibrio fluvialis* Hemorrhagic Cellulitis and Cerebritis. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 75–7.

Huq, M.I., Alam, A., Brenner, D., & Morris, G. (1980). Isolation of a vibrio – like Group, EF-6, from Patients with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 11 (6), 621-624.

Instituto Nacional de Salud. (2007). Informe de la resistencia antimicrobiana en Hospitales en Perú – 2007.

Instituto Nacional de Salud. (2012). Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario-2012.

Jones, J.B., Jackson, B., Balogh, B. Obradovic, A., Iriarte, F.B. & Momol, M.T. (2007). Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annu. Rev. Phytopathol*, 45, 245–62.

Jun, J., Shin, T.H., Kim, J.H., Shin, S.P., Han, J.E., Heo, G.J. *et al.* (2014), Bacteriophage Therapy of a *Vibrio parahaemolyticus* Infection Caused by a Multiple – Antibiotic – Resistant O3; K6 Pandemic Clinical Strain. *Journal of Infectious Diseases*, 210,72,8.

Kalatzis, P., Bastías, R., Kokkari, C. & Katharios, P. (2016). Isolation and characterization of two lytic bacteriophages ϕ St2 and ϕ Grn1 Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLoS ONE* 11(3): e0151101

Kita-Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K., y Simidu, U. (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, Determined based on 16SrRNA Sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 43(1), 8-19.

Kutateladze, M. y Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol*, 28(12), 591-5.

Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (2005). *Bacteriophages. Biology and Applications*: CRC Press. Florida, EE.UU.

Kysela, D & Turner, P. (2007). Optimal bacteriophage mutation rates for phage therapy. *Journal of Theoretical Biology*, 249, 411–421.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.

Lee, J.V., Shread, A.L & Furniss. L. (1981). Taxonomy and Description of *V. fluvialis* sp. nov. (Synonym Group F Vibrios, Group EF6). *Journal of Applied Bacteriology*, 50, 73-94.

Lee, H.S., Choi, S., Shin, H., Lee, J.H., Choi, S.H. (2014). *Vibrio vulnificus* Bacteriophage SSPOO2 as a possible biocontrol agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 8(2).

Leiman, P.G., Arisaka, F., van Raaij, M J., Kostyuchenko, VA., Aksyuk, and AA. Kanamaru, S & Rossmann, M.G. (2010). Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Viol J*, 7, 355.

Levine, W., Griffin, P. & the Gulf Coast Vibrio Working Group. (1993). The *Journal of Infectious Diseases*, 167, 479-83

Li, T.W., Ding, M.J., Zhang, J., Xiang, J.H. y Liu, R.Y. (1999). Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. (Resumen) Recuperado de:
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HYFZ199904004.htm

Li, A., Yang, W., Hu, J., Wang, W., Cai, T. & Wang, J. (2006). Optimization by orthogonal array design and humoral immunity of the bivalent vaccine against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* infection in crucian carp (*Carassius auratus* L.). *Aquaculture Research*, 37: 813-820

Liang, P. Cui, X., Du, X., Kan, B. & Liang, W. (2013). The virulence phenotypes and molecular epidemiological characteristics of *Vibrio fluvialis* in China. *Gut Pathogens* 5 (6).

Lin, Y.R., Chiu, CW., Chang, FY & Lin, C. (2012). Characterization of a new phage, termed ϕ /A318, which is specific for *Vibrio alginolyticus*. *Arch Virol* 157: 917–926.

Luo, Z.H., Yu, Y.P., Jost, G., Liu, WH., Huang, X-L & Gu, L. (2015). Characterization of two bacteriophages for specific treatment of biofilm formed by a *Vibrio* sp isolated from an abalone farm. *Aquaculture Research*, 47, 3964 – 3972.

Macián, M. C., Garay, E., Grimont, P. & Pujalte, M.J. (2004). *Vibrio ponticus* sp. nov., a Neighbour of *V. fluvialis* - *V. furnissii* Clade, Isolated from Gilthead Sea Bream, Mussels and Seawater. *System. Appl. Microbiol*, 27, 535–540.

Makarov, R. (2011). *Vibriófagos en el cultivo larvario del camarón y su relación con la incidencia y virulencia de Vibrio*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, México.

Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M, M., Tani, I., Fujieda, M., Wakiguchi, H. & Imai. S. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother*. 11:211–219.

Maura, D & Debarbieux, L. (2011). Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 851-859.

McNicol, L.A., Kaper, J.B., Lockman, E.F., Remmers, E.F., Spira, W.M., Voll, M.J & Colwell, R.R. (1980). R-Factor Carriage in a Group F *Vibrio* Isolated from Bangladesh. 1980. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17 (3), 512 -515.

Meza, A. (2016). Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* de Lima e Iquitos, Perú 2014 – 2015. (Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología. Universidad Católica de Santa María, Perú.

Middelboe, M., Chan, A. & Bertelsen, S.K. (2010). Isolation and life cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. *Manual of Aquatic Viral Ecology*. Chapter 13, 118 -133.

Ministerio de la Producción. (2013). Protocolo para el Monitoreo de Efluentes y Cuerpo Hídrico Receptor.

Morris, G. & Black, R. (1985). Cholera and other vibriosis in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 312 (6).

Negrete, P., Romero, J., Arredondo, J. (2004). Capacidad de *Vibrio fluvialis* (LEE, 1981) para producir infección en pez dorado (*Carassius auratus*. L). *Veterinaria México*, enero-marzo, 1-10.

Ning, S. X. & Nie, L. P. (1996). *Biological characterization of Bacteriophages NP-13 of Vibrio fluvialis* (Abstract). Recuperado de: <http://iucat.iu.edu/iub/articles/edsarl/edsarl.10009957.200006.15.2.145.148.a/?resultId=2&highlight=%22NP13%22>

Oakey, H.J. & Owens, L. (2000). A new bacteriophage VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 702-709.

Okano, S., Yoshikawa, T., De la Cruz, A. & Sakata, T. (2007). Characterization of *Vibrio harveyi* Bacteriophages Isolated from Aquaculture Tanks. *Mem.Fac.Fish. Kagoshima Univ.* 56, 55-62.

Ortigosa, M., Garay, E. & Pujalte, M.J. (1994). Numerical Taxonomy of Vibrionaceae Isolated from Oysters and seawater along an annual cycle. *System .Appl. Microbiol.* 17, 216-225.

Parisien, A., Allain, B., Zhang, R., Mandeville, R. & Lan, C.Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1–13.

Park, S.C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K. & Nakai, T. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen *Pseudomona plecoglossicida* as a candidate for disease control. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 1416 -1422.

Paterson, W.D., Douglas, J., Grinyer, I. & McDermott, L.A. (1969). Isolation and preliminary characterization of some *Aeromonas salmonicida* bacteriophages. *J. Fish. Res. Board Can*, 26, 629-632.

Pedersen, K., Austin, B., Austin, D.A & Larsen, J.L. (1999). Vibrios associated with mortality in cultured plaice *Pleuronectes platessa* fry. *Acta Vet Scand*, 40 (3) 263-70. (Abstract). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605143>

Pendland, R., Boniuk, M., & Wilhelmus, K. (2000). *Vibrio* ocular Infections on the U.S. Gulf Coast. *Cornea*, 19, 26-29.

Periasamy, D. & Sundaram, A. (2013). A novel approach for pathogen reduction in wastewater treatment. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13, 11(12).

Phumkhachorn, P & Rattanachaikunsopon, P. (2010). Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Afr J Microbiol*, 4, 1794 – 1800.

Pimienta-Rodríguez, Elsa T. (2013). Tratamiento con bacteriófagos como una alternativa antimicrobiana potencial. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, Mayo-Agosto.

Prada, C., Holguín, A., González, A., Vives, M., (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Univ. Sci*, 20 (1), 43-59.

Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G. & Shinoda, S. (2014). *Vibrio fluvialis*: an emerging pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 91 (5), 1-8.

Ratnaraja, N., Blackmore, T., Byrne, J., & Shi, S. (2005). *Vibrio fluvialis* Peritonitis in a Patient Receiving Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (1), 514-515.

Reacher, M.H., Shah, A., Livermore, D M., Wale, M.C. J., Graham, C. Johnson, A, P., *et al.* (2000). Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. *BMJ*, 320 (22), 213-6.

Ronda, C., Vásquez, M. & López, R. (2003). Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. *Revista AquaTIC*, 18, 3-10.

Sánchez, L & Corrales, L. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas, S.I. 3, (4), 21-29, dec. 2005. ISSN 1794-2470.

Sánchez, R. (2012). Lisis de *Arthrobacter* sp por un nuevo bacteriófago para el control biológico biomasa derivada de la degradación de ácido tereftálico (Tesis de Maestro en Ciencias en Bioprocesos). Instituto Politécnico Nacional-Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México.

Segundo A., Hernández, B., López V., Torres A. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 17-26.

Sharp, R. (2001). Review Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, 667-672.

Shurnik, M. & Strauch, E. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 5 –14.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, G. (2001). Bacteriophage Therapy, Minireview. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45, 649–659.

Summers, W.C. (2001). Bacteriophage Therapy. *Annu. Rev. Microbiol*, 55, 437-51.

Suthienkul, O. (1993). Bacteriophage typing of *Vibrio fluvialis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 4, (3).

Tall, B.D., Fall, S., Pereira, M.R., Ramos-Valle, M., Curtis, S.K., Kothary, M.H., Chu, D.M.T., et al. (2003). Characterization of *Vibrio fluvialis*-like strains implicated in limp lobster disease. *Appl. Environ. Microbiol*, 69, 7435–7446.

Talledo, M., Rivera, I., Lipp, E.K., Neale, A., Karaolls, D., Huq, A., y Colwell, R. (2003). Characterization of a *Vibrio cholera* phage isolated from the coastal water of Peru. *Environmental Microbiology* 5 (5), 350–354.

Tamariz, JH., Lezameta, L., Guerra, H. (2014). Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Rev Peru Salud Pública*, 31(1):69-77

Tamilselvan, S., Srikanth, P., Balaji, T.M., Viayalakshmi, T., & Suresh, R. (2004). Isolation of rare species *Vibrio fluvialis* in dental plaque. *Indian J Pathol Microbiol*. 47 (3), 448-9.

Tan, D., Gram, L., & Middelboe, M. (2014). Vibriophages and their interactions with the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (10), 3128 – 3140.

Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 493-499.

Thekdi, R.J. Lakhani, A.G. Rale, V.B., & Panse, M.V. (1990). An Outbreak of food poisoning suspected to be caused by *Vibrio fluvialis*. *J Diarrhoeal Dis Res. Dec*, 8 (4), 163-165.

Thiyagarajan, S., Chrisolite, B., Alavandi, S., Poornima, M., Kalaimani, N., & Santiago, C. (2011). Characterization of four lytic transducing bacteriophages of luminescent *Vibrio harveyi* isolated from shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries. *FEMS Microbiol Lett*, 325, 85 -91.

Thomas, J. A., Soddell, J. A., & Kurtboke, D.I. (2002). Fighting foam with phages? *Water Sci Technol*, 46,511-8

Thompson, F., Iida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 403–431.

Varghese, M.R., Farr, R.W., Wax, M. K., Chafin, B., y Owens, R.M. (1996). *Vibrio fluvialis* Wound infection associated with Medicinal Leech Therapy. *Clinical Infectious Disease*, 22, 709-10.

Vinod, M. G., Shivu, M.M., Umesha, K.R., Rajeeva, B.C., Krohne, G., Karanusagar, I & Karanusagar, I. (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255,117-124.

Vispo, N. & Puchades, Y. (2001). Bacteriófagos: de la terapia a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 18 (3), 135-147.

Wang, I-N (2006). Lysis Timing and Bacteriophage Fitness. *Genetics*, 172, 17–26

Wong, A. (1994). Purificación y caracterización biológica del bacteriófago uB19 específico de *Bacillus thuringiensis*. (Tesis de Maestría).Universidad Autónoma de Nuevo León.

World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.

Recuperado de:

<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.

World Economic Forum (2013). Global Risks 2013. Eight Edition 80p.

Recuperado de: <http://reports.weforum.org/global-risks-2013/>.

Yan, W.Z., Zhang, L.C. & (1997).Isolation and Characteristics of VP-a Marine of Bacteriophage of *Vibrio fluvialis*-II. Recuperado de:

http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-LNSZ200404024.htm

Yan, Q., Zhao, M., Wang, X., Zou, W., Chen, C. (2009). Adhesion mechanisms of *Vibrio fluvialis* to skin mucus of *Epinephelus awoara*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28 (2), 260-266.

Yu, Y.P., Gong, T., Jost, G., Liu, W.H., Ye, DZ & Luo, Z.H. (2013). Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS Microbiol Lett*, 348,112-119.